

MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN
DES BGA-HEMMSTOFFTESTES

Karl-Ernst Heimbücher

1975

Aus dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Lebensmittel
tierischen Ursprungs des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Vorstand: Professor Dr. Dr. h. c. L. K o t t e r

Arbeit angefertigt unter Leitung von

Privatdozent Dr. W. K u n d r a t

M Ö G L I C H K E I T E N U N D G R E N Z E N
D E S B G A - H E M M S T O F F T E S T E S

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Karl-Ernst Heimbücher

aus

Amorbach

München 1975

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität
München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Priv.-Doz. Dr. W. Kundrat
Koreferent: Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr



Tag der Promotion: 18. Juli 1975

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. SCHRIFTTUM	2
I. Hemmstoffe	2
II. Schäden für den Menschen	3
1. Gesundheitliche Schäden	3
a) Verschleierung des Keimstatus bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung	3
b) Zunahme von Allergien	4
c) Resistentwerden von pathogenen Mikro- organismen	3
2. Wirtschaftliche Schäden	7
III. Aufgaben eines Hemmstofftestes	8
IV. Warum biologische Hemmstoffteste	9
V. Grundlagen für Hemmstoffteste	10
VI. Frühere Untersuchungen	16
VII. Der allgemeine Hemmstofftest	22
VIII. Zuverlässigkeit des allgemeinen Hemmstoff- testes, Einfluß von Kontaminationsbakterien	23
C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	27
I. Hemmstofftest	27
1. Herkunft der Proben	27
2. Testmethodik	27
3. Ergebnisse	28

II. Kontaminationsbakterien

35

1. Herkunft der Bakterien und Gewinnung von Reinkulturen

35

2. Untersuchungsmethoden

35

3. Ergebnisse

37

III. Prüfung der isolierten Keime auf eigene

Hemmstoffbildung

38

1. Testmethodik

38

2. Ergebnisse

39

D. DISKUSSION

44

E. ZUSAMMENFASSUNG

53

F. LITERATURVERZEICHNIS

55

A. EINLEITUNG

Seit dem 1. 4. 1974 ist durch die geänderten Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschaugesetz die Untersuchung von Schlachttieren, die der amtlichen Schlachttier- und Fleischschau unterliegen, sowie des von ihnen gewonnenen Fleisches in Verdachtsfällen und darüber hinaus stichprobenweise auf Rückstände gesetzlich vorgeschrieben.

Für den Nachweis von Hemmstoffen im Schlachtkörper wurde der standardisierte allgemeine Hemmstofftest entwickelt. Die Standardisierung erstreckt sich auf die Ausführung und Beurteilung des Testes, sowie auf die Auswahl und Behandlung der Proben vor dem Test.

Bis die Proben, Skelettmuskulatur und Niere, zur Untersuchungsstelle gelangen, sind sie jedoch unterschiedlichen Einflüssen unterworfen, man denke nur an die verschieden langen Transportzeiten. Aufgabe dieser Arbeit ist es, den Einfluß von verschiedenen Temperatureinwirkungen und Lagerzeiten der Proben auf den allgemeinen Hemmstofftest herauszufinden, sowie auftretende Kontaminationskeime zu erfassen.

B. S C H R I F T T U M

I. HEMMSTOFFE

Unter Hemmstoffen versteht man Substanzen, die mikrobiologische Wachstumsvorgänge zu hemmen vermögen. Von besonderem Interesse für die tierärztliche Lebensmittelhygiene sind Stoffe, die dem Tier und dem Lebensmittel tierischer Herkunft von außen zugeführt werden (Schaal (82)).

Die Hemmstoffe kann man unterteilen in natürliche, im Fleisch und in der Milch vorkommende und entstehende und in von außen in das Tier oder an das Lebensmittel gelangende. Kotter u.A. (53) wiesen die Hemmwirkung von Inhibinen der Galle nach, van Schothorst (89), Roth (79) und Mantel (64) zeigten die Hemmung durch Milchsäure. Die von außen zugeführten Substanzen können natürlicher Art oder Pharmaka sein.

Sehr viele Pflanzen enthalten Hemmstoffe, z.B. Kapuzinerkresse, Gartenkresse, Petersilie (Winter (110), Welz (107)), auch der Presssaft von Hahnenfußgewächsen, Meerrettich, Zwiebeln, Porree, Bärlauch, Stachelbeeren, Kapuzinerkresse, Gartenkresse und Eicheln kann antibiotische Wirkungen (Vogel (104)) zeigen.

Pharmaka werden dem Tier zugeführt in nutritiven Dosen, um die Mastleistung zu verbessern, in therapeutischen Mengen, um eine Krankheit des Tieres zu heilen. Im Extrem kann der Gesundheitszustand des Schlachtviehs verschleiert werden.

II. SCHÄDEN FÜR DEN MENSCHEN

Hemmstoffe in Nahrungsmitteln können

1.) die menschliche Gesundheit gefährden und

2.) wirtschaftlichen Schaden verursachen.

1a.) Die Verschleierung des Keimstatus vorbehandelter Tiere bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung.

Clarenburg und Kampelmacher (23) wiesen schon 1957 gehemmtes Keimwachstum bei *Bacillus anthracis* und *Salmonellen* nach. Nach Behandlung eines an Milzbrand erkrankten Tieres mit "Depomycine" konnten sie keine Milzbrandbazillen mikroskopisch feststellen, das Wachstum der Bakterien war gehemmt. Bei 22 salmonellosekranken Kälbern wurden nach Aureomycinfütterung (Chlortetracyclin) in acht Fällen die Keime erst in der Anreicherung festgestellt. Foltin (30), Meyn, Kalich und Merkenschlager (70) fanden, daß nutritive Dosen von Aureomycin *Salmonellen*wachstum nicht beeinflussen, wohl aber die therapeutischen Dosen dieses Antibiotikums.

Gemmer und Seeger (35) konnten bei einem mit Streptomycin behandelten Bullen nur mit Schwierigkeiten Milzbranderreger feststellen, der isolierte Stamm zeigte deutliche Penicillinresistenz. Bonfert und Berang (13) fanden Hemmung von *Salmonellen*-Reinkulturen durch hemmstoffpositives Organmaterial.

Forschner (31) fand, daß bei hemmstoffpositiven Proben der unspezifische Keimgehalt vermindert war und Sawatzki (80) sah bei 145 von 2 000 Fällen einen Einfluß auf die

"Bakteriologische Untersuchung" als bewiesen an. Es ist auch daran zu denken, daß kranke Tiere durch Antibiotika-Applikationen scheinbar soweit wieder hergestellt werden, daß sie zum Zeitpunkt der Schlachtung einen gesunden Zustand vortäuschen und damit der bakteriologischen Untersuchung entgehen können.

1b.) Zunahme der Allergien.

Die Zunahme ist nicht nur im Bereich der Humanmedizin festzustellen. So weisen Mayr und Bibrack (67) 1969 auf das Problem des vermehrten Vorkommens der allergischen Erkrankungen beim Tier hin. Sie betonen, daß abhängig von der chemischen Struktur, der Bindungsfähigkeit an geeignete Trägerproteine, sowie vom Applikationsmodus, der Dosis und der Art der Verabreichung Antibiotikapräparate sowohl humorale Allergien (Soforttyp) immunzellgebundene Allergien (Spättyp) als auch anaphylaktische Reaktionen auslösen können. Knothe (51) sieht die Möglichkeit einer Allergisierung des Menschen durch Anwendung von Arzneimitteln in der Tierernährung. Eine weitergehende Gefährdung kann nach seiner Meinung nur beim therapeutischen Einsatz von Antibiotika auftreten.

Geringe Antibiotikamengen über das Lebensmittel Fleisch zugeführt, können auch beim Menschen in verstärktem Maße zu Allergien führen. Eine Inaktivierung der Hemmstoffe wird verschieden beurteilt. Brüggemann und Tiews (16) behaupten, daß eine Zerstörung des Aureomycins beim Kochen stattfindet. Brüggemann u. A. (17) fanden, daß Bra-

ten und Kochen die Aktivität von im Knochen abgelager-
tem Tetracyclin nicht vermindert, nur bei pH-Werten
unter 6,0 (z.B. Kochen im Sauerkraut) ergab sich
eine Verminderung bis 70%.

Scheibner (84) stellte bei zwanzigminütigem Kochen von
positiven Fleischproben keine Antibiotikaaktivität mehr
fest. In einer anderen Arbeit (85) berichtet er über
das Vorhandensein von Restaktivitäten von 32% -45% bei
der Verarbeitung von ursopen-, ursocyclin- und strepto-
mycinhaltigem Fleisch zu geräucherten Brühwürsten. Schmidt
und Woltersdorf (87) fanden beim Erhitzen von Kalbfleisch,
das Chlortetracyclin - bzw. Oxytetracyclinrückstände von
0,02 - 0,2 ppm enthielt ein negatives Ergebnis im allge-
meinen Hemmstofftest. Beck und Mantel (7) hatten bei Ein-
wirkung von Temperaturen zwischen +80°C und 100°C über
20 Minuten an hemmstoffpositiven Nieren keine Änderung
des positiven Wertes.

Pichnarcik, Wenzel und Gisske (75) bewiesen, daß selbst
die in der Literatur als thermolabil angegebenen Antibio-
tika wie Bacitracin und die Tetracycline, den Kochpro-
zeß bei +100°C für 20 Minuten unter Einhaltung des opti-
malen pH-Bereiches überstehen.

Es ist also zu erwarten, daß im Fleisch enthaltene Hemm-
stoffe nach der Zubereitung unverändert vom Menschen auf-
genommen werden können.

Auch Lagerung von Fleisch bei -20°C über 12 Wochen ergab
nur eine geringgradige Inaktivierung der ursprünglich vor-
handenen Hemmstoffe (Beck und Mantel (7)). Grossklaus

(38) weist auf die Tatsache hin, daß beim Erhitzen wohl die thermolabile antibiotische Komponente eines Mittels zerstört werden kann, nicht immer aber zugleich die allergisierende.

1c.) Resistentwerden von pathogenen Mikroorganismen.

Ein weiteres Problem stellt das Ansteigen der resistenten Keime bei Mensch und Tier dar, für das in starkem Maße unsachgemäße Verwendung von Antibiotika durch Laien verantwortlich gemacht wird (Mantel (65)).

Bulling, Stephan und Sebek (19) haben sich mit dem Problem der übertragbaren Antibiotikaresistenz befaßt und kamen zu dem Ergebnis, daß innerhalb von 10 Jahren der Anteil resistenter Salmonellenstämme von 2,2% auf 9,5% anstieg, bei *Salmonella typhimurium* (ohne ssp. copenhagen) gar von 6% auf 27%.

Knothe (50) weist auf das Resistentwerden von Keimen durch Behandlung des Menschen und tierischer Nahrungsmittel hin, dabei sind zwei Tatsachen von Bedeutung, nämlich die Resistenz von Mikroorganismen gegen mehrere Antibiotika (Mehrfachresistenz) und die Übertragung von sogenannten R-Faktoren, das heißt Übertragung der Resistenz von einer Bakterienart auf die andere.

Beyer u. A. (10) konnten bei Schweinen durch Verfüttern von 20 ppm Terramycin als auch von 20 ppm Chloramphenicol feststellen, daß alle antibiotikaempfindlichen coliformen Keime durch resistente ersetzt wurden; die Gesamtzahl der Coliformen blieb gleich. Diese Keime konnten durch Pfleger und Gerät leicht übertragen werden. Den

hohen Anteil von terramycinresistenten Keimen zu Anfang ihres Versuches erklären sie durch die weitverbreitete nutritive Anwendung des Terramycins. In zwei weitergehenden Arbeiten bewiesen Bulling und Stephan (20,21), in einem Chloramphenicolfütterungsversuch an Schweinen, daß die Antibiotikaresistenz der coliformen Keime, die die sensible Flora unter dem Einfluß der Antibiotikabeifütterung ersetzen, durch R-Faktoren erfolgt. Sie konnten R-Faktoren in vitro wie in vivo von den coliformen Keimen auf Salmonellen übertragen. Resistente Salmonellen waren nur bei klinisch manifester Salmonellose ihrer Versuchstiere nachzuweisen.

Kusch u. A. (60) untersuchten 1174 Staphylokokkenstämme unterschiedlicher Herkunft. Während Stämme aus Lebensmitteln zu einem geringen Prozentsatz resistent waren und die Stämme aus Krankenhausmaterial meist Mehrfachresistenz aufwiesen, zeigten die aus Schweinen gewonnenen Stämme eine isolierte Resistenz gegen Tetracyclin, was auf den Tetracyclinegehalt des Mastfutters zurückgeführt wurde.

Bisping (11) fordert wegen Allergie- und Resistenzproblemen eine Einschränkung der Antibiotikatherapie und vorherige Testung der Keime in vitro.

2.) Wirtschaftliche Schäden

Durch Hemmstoffe können dem Menschen nicht nur gesundheitliche, sondern auch wirtschaftliche Schäden erwachsen. Alle Produktionsvorgänge, bei denen im Nahrungsmittelgewerbe Mikroorganismen beteiligt sind, können durch Hemmstoffe gestört werden. Dieses Problem ist vor allem

in der Milchwirtschaft schon lange bekannt. Terplan und Zaadhof (101) berichteten 1967 über eine Umfrage bei 382 bayerischen Molkereien, bei denen in 24% der Betriebe durch Hemmstoffe Schadensfälle in der Käserei, bei der Yoghurtherstellung oder Sauerrahmbutterung auftraten. Ein großes Käsewerk hatte innerhalb weniger Tage einen Schaden von 80 000,- DM. Marth und Ellikson (66) stellten fest, daß 100 000 i. E. Penicillin mit der Milch einer behandelten Kuh ausgeschieden, 10 000 l in der Verarbeitungsfähigkeit für Käse und Yoghurt beeinträchtigen oder gar unbrauchbar machen können.

III. AUFGABEN EINES HEMMSTOFFTESTES

Aufgabe eines allgemeinen Hemmstofftestes muß es sein, möglichst alle von außen zugeführten Hemmstoffe, die zu biologisch aktiven Rückständen führen und damit dem Menschen schaden können, nachzuweisen. Unter den denkbaren Stoffen wie z. B.

Antibiotika

Sulfanilamide

Nitrofuranderivate

Hormone

Sedativa

Reinigungs- und Desinfektionsmittel

spielen nach Kundrat (59) nur die Chemotherapeutika eine entscheidende Rolle, da sich Reinigungs- und Desinfektionsmittel nicht in nachweisbaren Mengen vorfinden. Terplan u. A. (102)

können sich das Auftreten von geringen Hemmhöfen bei Dexamethasonester nicht erklären. Es ist zu bedenken, daß viele Arzneimittel von vorneherein nicht zu biologisch aktiven Rückständen führen können. Schuler (82) untersuchte Gewürze, Enzyme und verschiedene Arzneimittel mit *Sarcina lutea* und kommt zu dem Ergebnis, daß Antibiotika und Sulfanilamide klare Hemmhöfe ergeben.

IV. WARUM BIOLOGISCHE HEMMSTOFFTESTE ?

Da nur geringste Hemmstoffmengen sicher nachgewiesen werden müssen, die chemische Struktur der möglichen Substanzen aber sehr verschieden ist, kommen für den Routinebetrieb nur biologische Tests in Betracht (Klima (49), Terplan und Zaadhof (101), Sinell (95), Meyer u. A. (69), Pichnarcik u. A. (75), Kundrat (58), Pie-ning (76), Schulz (93)). Zudem besteht der Sinn eines Hemmstofftestes darin, biologisch aktive Rückstände zu erfassen und dies ist mit physiko-chemischen Methoden unmöglich.

Ein mikrobiologischer Test unterliegt natürlich Unwägbarkeiten. Störend wirkt auch, daß man weder Art, noch Konzentration eines Hemmstoffes in einfacher Weise bestimmen kann. Schaal (82) beweist, daß mit dem allgemeinen Hemmstofftest nicht einmal die Konzentration eines bekannten Antibiotikums nachgewiesen werden kann.

Van Schothorst (90) hat eine relativ einfache Methode zur Differenzierung der Antibiotika ausgearbeitet. Er stellt ein Diagramm der Hemmhofgrößen von bestimmten Substanzen mit verschiedenen Testkeimen auf und vergleicht nun damit die Höfe seines Testmaterials. Diese Methode befriedigt jedoch nicht und versagt nach seinen eigenen Aussagen bereits beim Vorliegen einer Mischung von

zwei Antibiotika.

Wenzel (108) und Roth (79) haben ein kombiniertes mikrobiologisch-chemisches Nachweisverfahren entwickelt, das es ermöglicht, Hemmstoffe elektrophoretisch zu trennen und dann mikrobiologisch nachzuweisen. Danach kann man an Hand der Wanderstrecken von bekannten Antibiotika den fraglichen Hemmstoff bestimmen. Roth wies unter anderem die inhibitorische Wirkung der Fleischmilchsäure in Konzentrationen nach, die im Fleisch nie erreicht werden. Auch Beck und Mantel (7) sprechen der im Fleisch vorhandenen Milchsäurekonzentration die Nachweisbarkeit im allgemeinen Hemmstofftest ab.

Rein chemische Nachweismethoden werden von Schaal (82) für Chloramphenicol, Streptomycin und Dihydrostreptomycinsulfat, Penicillin und für die Tetracycline beschrieben. Einer chemischen oder chemophysikalischen Bestimmung von Antibiotika im Fleisch von Schlachtieren stehen jedoch der große Material- und Zeitaufwand entgegen, die eine Anwendung im Routinebetrieb als kaum durchführbar und wenig sinnvoll erscheinen lassen.

V. GRUNDLAGEN DER HEMMSTOFFTESTE

Das Prinzip aller biologischen Nachweismethoden beruht auf einer Verminderung des Wachstums oder der Stoffwechselaktivität eines Testkeimes durch hemmstoffhaltiges Untersuchungsmaterial. Grundsätzlich kann man den Hemmstofftest in flüssigem, wie auch in festem Medium ausführen. Die ersten Versuche wurden bei Milch und damit in flüssigem Medium durchgeführt (Blyth (12) wies bereits 1901 die Hemmung von Yoghurtkulturen durch Desinfektions-

mittel nach). Mit der Zeit setzten sich aber die Methoden mit festen Nährböden mehr und mehr durch und werden auch verstärkt (Schaal (82)) in der Milchwirtschaft eingesetzt.

Methoden, welche die Wachstumsminderung eines Testkeimes sichtbar machen:

A.) Auf sichtbarem Wachstum beruhend:

a.) Röhrchentest

b.) Agardiffusionstest

zu a.) Beim Röhrchentest wird die Wachstumsintensität des Testkeimes an Hand der Trübung des flüssigen Nährmediums gemessen und mit einer hemmstofffreien Probe verglichen.

zu b.) Die Hemmstoffe diffundieren in den festen Agarnährboden und verhindern im Bereich ihres Diffusionsfeldes den Testkeim am Wachstum. Den Agardiffusionstest kann man in zwei Variationen ausführen und zwar, weniger gebräuchlich, mit linearer Diffusion im Röhrchen und mit radialer Ausbreitung der Hemmstoffe auf der Testplatte.

B.) Verminderung der Stoffwechselleistung eines Testkeimes

a.) Reduktionmethoden

b.) Säurebildung durch Testkeime

zu a.) Durch Hemmstoffe werden die Testbakterien so geschwächt, daß sie nicht mehr in der Lage sind, einen Indikatorfarbstoff zu reduzieren, was am Ausbleiben eines Farbumschlages erkennbar ist. Im Katalasetest ist die verminderte Gasbildung ein Maß für die gehinderte Stoffwechselaktivität der Testkeime. Die Reduktionsmethoden

wurden in verschiedenen Modifikationen ausgeführt.

Kotter u.A. (52), von Sprockhoff (97), Schaal (81), Schulz (93), Piening (76) und Brunn (18) benutzen den Reduktionstest mit 2, 3, 5 - Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). Sie weisen darauf hin, daß bei diesem Verfahren das rote Triphenylformazan, welches aus dem TTC durch Reduktion entsteht, beständig gegen Luft-sauerstoff ist.

Frank (33), Brunn (18) und Schönherr (88) verwendeten als Indikator Methylenblau. Des weiteren kamen Brillant-schwarz (Kraak und Tolle (54,55)) und Indigokarmin (Stavikova (98)) zur Anwendung.

Nach Kundrat (58) zeigt das Resazurin die größte Empfindlichkeit und hemmt die Testkeime nur gering. Ferner erwähnt er Lackmus und Janusgrün als Redoxindikatoren.

Kretzer (56) und Piening (76) arbeiteten mit dem Katalasetest. Außerdem gibt es noch verschiedene, weniger gebräuchliche Reduktionsverfahren, die kaum Eingang in die Hemmstoffuntersuchung gefunden haben.

zu b.) Bei Anwesenheit von Hemmstoffen bleibt eine Säuerung des Nährsubstrats durch die Testkeime aus, was wiederum durch einen Farbindikator angezeigt wird. Dieses Verfahren fand vor allem in der Milchuntersuchung Eingang.

Die sogenannte Säuerungshemmungsmethode von Sturm (99) Welz (106 und Schönherr (88) benutzt Yoghurtkeime und Lackmus als Indikator. Bleibt eine Säuerung innerhalb von 3 - 4 Stunden aus, so kann auf Anwesenheit

von Hemmstoffen geschlossen werden.

Kundrat (58, 59) entwickelte einen Säurehemmungstest auf festem Nähragar mit *Bacillus stearothermophilus* und Lackmus bzw. Bromkresolpurpur als Indikator.

Testkeime für den Hemmstofftest:

Als Testkeime kommen alle antibiotikaempfindlichen Bakterien in Frage. Pichnarcik u.A. (75) nennen drei Keime, nämlich *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus*, die in der Hemmstoffuntersuchung benutzt werden. Schaal (82) untersuchte 23 Keime, nämlich verschiedene Stämme von *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* München, *Bacillus cereus* variatio mycoides, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella*, *Serratia marcescens*, *Achromobacter* 2 und *Flavobacter* ssp.. Er empfiehlt für eine Untersuchung, bei der die absolute Empfindlichkeit des Keimes das Beurteilungskriterium ist, folgende Keime:

Bacillus subtilis VUA Krefeld

"	"	Bremen
"	"	BGA
"	"	CB 841
"	"	ATCC 6633
"	"	B 54

Er betont, daß es keinen Keim gibt, der gegen alle üblichen Antibiotika eine optimale Empfindlichkeit zeigt.

Für einen allgemeinen Hemmstofftest bieten sich die apathogenen, aeroben Sporenbildner besonders an. Sie sind in Form einer Sporensuspension gut lager- und versandfähig und bieten Gewähr für eine

gleichmäßige Keimeinsaat. Da aber nicht alle Bakterien auf die verschiedenen Antibiotika gleichmäßig ansprechen, müssen zu einer genauen Untersuchung verschiedene Keime herangezogen werden (Wenzel (109)). Ferner ist mittels bekannter Substanzen immer wieder auf Antibiotikaempfindlichkeit und Resistenzbildung zu prüfen.

Für das Aufbringen des Testmaterials gibt es verschiedene Methoden:

1.) Zylindertest

Oberzill (74), Brüggemann u. A. (17)

2.) Agarlochtest

Coretti (24), Käferstein (41), Meyer u.A. (69)

3.) Auflegeverfahren

a.) einfach, Lorenzen (63), Bartels u. A. (4)

b.) Gefrierblockmethode nach Gartside (34), Bonfert und Berang (13), Forschner (31)

4.) Blättchenmethode

Kelch und Coretti (43), Schaal (81), Forschner (32), Klima (49), Käferstein (41)

zu 1.) Beim Zylindertest werden kleine Kunststoff- oder Metallzylinder auf der Agaroberfläche leicht eingedrückt und in die Röhrchen das flüssige Untersuchungsmaterial gegeben. Bei festem Material ist dabei eine Zerkleinerung und Aufschwemmung des Feststoffes in Pufferlösung notwendig.

zu 2.) Man stanzt Löcher aus dem Agarnährboden und bringt nun in die Vertiefungen die zu untersuchende Flüssigkeit, das suspensierte Untersuchungsmaterial oder auch

ganze Fleisch- oder Organstückchen.

zu 3.) Die Testausführung beim Auflegeverfahren ist einfach.

Man legt die zu untersuchenden Probestückchen entweder einfach auf die Agaroberfläche oder man gefriert die Proben und bringt sie gefroren auf, damit beim Auftauen mehr Gewebesaft austreten kann (Gartsidemethode).

zu 4.) Die Blättchenmethode ist eine Modifikation des Auflegeverfahrens. Man legt einen Einschnitt in das Untersuchungsmaterial, taucht hierin ein Filterblättchen und wartet, bis es sich mit Gewebesaft vollgesogen hat. Nun bringt man das Blättchen auf die Agaroberfläche, wo die Untersuchungsflüssigkeit in den Nährboden diffundieren kann.

Die Einsaat der Testkeime kann man nun in zweierlei Weise vornehmen:

- a.) als Oberflächenverfahren (Meyer u. A. (69)); die Testorganismen werden auf die Agaroberfläche aufgebracht.
- b.) als Agar-Bakteriengemischverfahren, bei dem die Testkeime dem flüssigen Agar vor dem Ausgießen zugegeben werden und damit im gesamten Nährmedium verteilt sind.

Pichnarcik u. A. (75) stellen eine Überlegenheit des Agarbakteriengemisches gegenüber dem Oberflächenverfahren fest. Ferner fanden sie einen Einfluß der Keimeinsaatmenge und der Agarschichtdicke auf die Größe der Hemmhöfe in der Art, daß sowohl Erhöhung der Keimeinsaat, als auch Vergrößerung der Agarschichtdicke über 2 mm, kleinere Hemmhöfe bedingen. Sie betonen einen entscheidenden Einfluß des pH-Wertes. Größere Hemmhöfe fanden sie für pH 8

bei: Erythromycin
 Kanamycin
 Neomycin
 Oleandomycin
 Streptomycin
 Sulfanilamiden.

Bacitracin und Chloramphenicol zeigten keine Einflußnahme des pH-Wertes, während bei pH 6 die Tetracycline und Penicilline größere Hemmhöfe aufwiesen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Angaben von Walter und Heilmeyer (105) gut überein, welche die optimale Wirkung einiger Antibiotika in folgendem pH-Bereich angeben:

Penicillin G	6,0 - 6,5
Streptomycin, Dihydrostreptomycin	7,5 - 8,0
Tetracycline	5,5 - 7,3
Chloramphenicol	2,0 - 9,0
Erythromycin, Oleandomycin	8,0 - 8,5
Neomycin, Kanamycin	7,6 - 8,0
Polymyxin	6,5 - 7,5

VI. FRÜHERE UNTERSUCHUNGEN

In den letzten Jahren haben viele Tierärzte Not- und Krankschlachtungen mit den verschiedensten Methoden und Testkeimen auf Hemmstoffe untersucht.

Darüber gibt folgende Tabelle Auskunft. Sie zeigt die Anzahl der untersuchten Tiere und die Ergebnisse der Untersucher.

Tabelle I

Autor/Jahr	Nachweismethode/ Testkeim	Untersu- chungs- material	Proben- anzahl/ Tierart	pos. Proben absol.- %
<u>Kotter</u> (53) 1960	TTC-Reduktions- test Staph. aureus	Niere	500 Proben	80 - 16,0%
<u>Kissling</u> (46) 1960	Agarbakterien- gemisch Bac. cereus	Niere Leber Milz Muskel	48 Proben 27 Kälber 17 Rinder 3 Pferde 1 Schwein	10 - 20,8% 6 - 22,3% 3 - 17,6% 1 - 33,3% -
<u>Forschner</u> (31) 1962	Gartside-Methode Oberflächenver- fahren Bac. subtilis	Niere, im posit. Fall Milz Leber	6 584 Proben Kälber Rinder Pferde Schweine	388 - 5,9% - 10,0% - 4,2% - 16,2% - 4,9%
<u>Kampelma- cher</u> (42) u.A. 1962	Zylindertest Staph. aureus Staph. albus Bac. subtilis	Urin	95 Proben 31 Kälber 51 Rinder 13 Schweine	27 - 28,4% 18 - 68,8% 6 - 11,7% 3 - 23,0%
<u>Bartels/ Gerigk</u> (5) 1964	Plättchenmethode Agarlochtest Gefrierblockver- fahren Bac. cereus Bac. subtilis	Galle Leber Milz Muskel	56 Proben	24 - 42,8%
<u>Klima</u> (49) 1966	Gartside-Methode Plättchenmethode Bac. cereus	Niere	11 566 Proben Kälber Kühe Bullen Schweine Schafe	103 - 0,98% 20 - 15 - 60 - 60 - 8 -
<u>Kind</u> (45) 1966	Gartside-Methode Bac. subtilis Staph. aureus	Niere	500 Proben	16 - 3,2%
<u>Lorenzen</u> (63) 1967	Oberflächenver- fahren einfaches Auf- legeverfahren Bac. subtilis	Niere	11 436 Proben 1 962 Kälber 4 628 Rinder 793 Pferde 4 103 Schweine	148 - 1,3% 23 - 1,2% 63 - 1,4% 9 - 1,2% 51 - 1,2%

Autor/Jahr	Nachweismethode/ Testkeim	Untersu- chungs- material	Proben- anzahl/ Tierart	pos. Proben absol.- %
<u>Bonfert u. Berang</u> (13) 1969	1. Gartside-Meth. Oberflächen- verfahren Staph. aureus	Niere Leber Galle	4 857 Proben	248 - 5,8%
	2. Oberflächen- verfahren ohne Vorbehandlung des Materials Micr. aureus	Niere	2 022 Proben	151 - 7,5%
	3. wie 2 mit Micr. aureus Bac. subtilis Bac. cereus	Niere	1 681 Proben	238 - 15,0%
<u>Meyer u.A.</u> (69) 1969	1. Auflegemetho- de auf Brom- kresol-Purpur Laktose-Platte	Niere	5 000 Proben	688 - 13,8%
			703 Kälber	252 - 35,8%
			2 716 Rinder	304 - 11,2%
			34 Pferde	2 - 5,9%
	2. Agarlochrometho- de Bac. cereus Bac. subtilis Staph. aureus		1 496 Schweine 48 Schafe 3 Ziegen	125 - 8,3% 5 - 10,4% - -
<u>Takacs u. Kovacs</u> (100) 1969	Gartside-Methode Oberflächenver- fahren Bac. subtilis Staph. aureus Sarc. lutea E. coli	Niere	244 Proben 28 Kälber 173 Rinder 37 Pferde 6 Schafe	62 - 24,6% 12 - 42,8% 40 - 23,1% 8 - 21,6% 2 - 33,3%
<u>Gemmer u. Seeger</u> (35) 1970	einfaches Aufle- geverfahren Bac. cereus	Niere Leber Muskel Milz Lymph- drüsen	3 889 Proben 516 Kälber 1 640 Rinder 119 Pferde 1 670 Schweine 41 Schafe u. Ziegen	334 - 8,6% 67 - 12,9% 144 - 7,8% 17 - 14,3% 105 - 6,4% 1 - 2,4%
<u>Schaper</u> (83) 1970	Gartside-Methode Agarbakterienge- misch Bac. cereus Bac. subtilis Staph. aureus	Niere Leber Muskel Milz	394 Proben 231 Rinder 163 Schweine	87 - 22,1% 72 - 31,3% 15 - 9,3%

Autor/Jahr	Nachweismethode/ Testkeim	Untersu- chungs- material	Proben- anzahl/ Tierart	pos. Proben absol.- %
<u>Wenzel</u> (109) 1971	Gartside-Methode Bac. cereus Bac. subtilis Staph. aureus	Niere Leber Muskel Milz	395 Proben 231 Rinder 164 Schweine	85 - 21,8% 70 - 30,3% 15 - 9,3%
<u>Nassal u. Nieper</u> (72) 1971	einfaches Auf- legeverfahren Bac. subtilis	Niere	6 060 Proben	438 - 7,2%
<u>Sawatzki</u> (80) 1971	einfaches Auf- legeverfahren Oberflächen- und Agarbakteriengen- mischverfahren Bac. subtilis Sarc. lutea	Niere Muskel	2 000 Proben Kälber Bullen u. Rinder Kühe Schweine Schafe u. Ziegen	273 - 13,7% 38 - 27,0% 56 - 12,9% 84 - 14,2% 90 - 11,4% 3 - -
<u>Dedek u.A.</u> (27) 1971	Gartside-Methode Agarbakterien- gemisch Bac. subtilis Staph. aureus	Niere	5 247 Proben 400 Kälber 2 354 Rinder 97 Pferde 2 288 Schweine 93 Schafe 15 Ziegen	63 - 1,1% 18 - 4,5% 24 - 1,0% 1 - 1,0% 17 - 0,7% 3 - 3,2% - -
<u>Draheim</u> (28) 1971	einfaches Auf- legeverfahren Oberflächenver- fahren Staph. aureus	Niere	1 265 Proben 291 Kälber 720 Rinder 14 Pferde 219 Schweine 20 Schafe 1 Ziege	145 - 11,5% 60 - 20,6% 61 - 8,5% 1 - 7,0% 23 - 10,5% - - - -
<u>Mantel</u> (64) 1971	einfaches Auf- legeverfahren Agarbakterien- gemisch Bac. subtilis	Niere	4 939 Proben 861 Kälber 2 237 Rinder 1 841 Schweine	354 - 7,2% 114 - 13,3% 134 - 5,8% 106 - 5,7%
<u>Bethke u. Püschner</u> (9) 1972	einfaches Auf- legeverfahren Bac. subtilis	Niere Leber Muskel	20 956 Proben 4 232 Kälber 11 089 Rinder 80 Pferde 5 261 Schweine 294 Schafe	2 666 - 13,0% 914 - 22,0% 1 398 - 12,0% 8 - 10,0% 318 - 7,0% 8 - 3,0%

Tabelle II zeigt die Ergebnisse der Hemmstoffuntersuchungen der Bakteriologischen Fleischuntersuchungsstelle des Städtischen Schlachthofes München vom Mai 1974 - Dezember 1974 (Püschner (78)). Hierbei fällt vor allem der hohe Prozentsatz hemmstoffpositiver Schweine auf.

Tabelle II

Zahl der bakteriologischen Untersuchungen

	Rinder unter 12 Monaten	Rinder über 12 Monaten	Schweine	Schafe	Pferde
Mai	215	1 023	316	31	6
Juni	240	835	270	27	7
Juli	277	799	275	31	7
Aug.	194	852	248	13	5
Sept.	230	810	262	32	10
Okt.	209	1 061	317	33	7
Nov.	230	879	287	40	2
Dez.	330	827	278	31	6
GESAMT	1 925	7 086	2 253	238	50

davon positiv

	M	N	MN	M	N	MN	M	N	MN	M	N	MN	M	N	MN
Mai	-	22	4	-	56	6	-	19	-	-	1	-	-	1	1
Juni	-	45	3	-	56	7	-	24	4	-	1	-	-	1	-
Juli	-	30	8	-	43	2	-	8	2	-	-	-	-	4	-
Aug.	-	22	3	-	53	4	-	32	-	-	-	-	-	1	-
Sept.	-	41	2	-	69	7	-	84	1	-	-	1	-	6	-
Okt.	-	31	10	-	69	5	-	90	1	-	-	1	-	-	-
Nov.	-	44	12	-	56	13	-	95	1	-	1	-	-	-	-
Dez.	-	57	10	-	99	6	-	127	2	-	3	-	-	4	-
GESAMT	334 = 17,8%			551 = 7,8%			490=21,8%			8, = 3,4%			18 = 36,0%		

Zeichenerklärung:

M = Hemmhof (größer als 2 mm) um die Muskulatur
 N = " " " " " " " Niere
 MN= " " " " " " " Muskulatur und Niere

Daneben gab es in jüngster Zeit auch Untersuchungen bei Normal-schlachtungen. So prüften Bartels und Gerigk (5) 1964 104 Pro-ben und fanden nur positive Gallenwerte, die Organe und die Mus-kulatur waren negativ.

Mantel (64) untersuchte 433 Kälber im Auflegeverfahren mit *Bacil-lus subtilis* und fand 83 hemmstoffhaltig, das sind 19 %. Klein (47) benutzte das gleiche Verfahren bei 163 Rindern, 173 Schwei-nen und 149 Kälbern. Er hatte bei den Rindern 4 positive Fälle = 2,4 %, 21 = 12,1 % positive Schweine und 81 = 54,4 % positive Kälber. In Hannover arbeiteten mit einem von Pichnarcik u.A. (75) standardisierten Hemmstofftest, Gisske u.A. (36), Heilmann (40), Schaper (83) und Drews (29) über Normalschlachtungen bei Rindern, Kälbern und Schweinen.

Wenn man nun die gefundenen Ergebnisse der einzelnen Forscher we-gen der Verschiedenheit der angewendeten Methoden, der benutzten Testkeime, des Beurteilungsmodus, sowie der unterschiedlichen Zahl der Tiere, als auch wegen der andersartigen landwirtschaft-lichen Struktur der einzelnen Einzugsgebiete nicht unmittelbar miteinander vergleichen kann, so weisen sie doch gemeinsam einen erschreckenden Anstieg innerhalb der letzten Jahre nach. So bestimmten Gisske (36) u.A. 1970 etwa 67,3 % aller untersuch-ten normalgeschlachteten Kälber positiv, während Heilmann (40) 1971 bereits 84,4 % fand. Über ein ähnlich hohes Ergebnis von 113 positiven Tieren von 137 untersuchten (82,5 %) berichteten Bartels u.A. (4).

VII. DER ALLGEMEINE HEMMSTOFFTEST

Auf Grund der teilweise alarmierenden Ergebnisse der verschiedenen Hemmstoffuntersuchungen, wurde am 18. Dezember 1973 die Verordnung zur Änderung der Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschau-gesetz erlassen (103). Es wird hier die Untersuchung aller Tiere, die der bakteriologischen Fleischuntersuchung zugeführt werden, auf Hemmstoffe bindend vorgeschrieben. Außerdem müssen 1 % aller normal geschlachteten Tiere stichprobenartig auf Antibiotika untersucht werden. Eine derartige gesetzliche Handhabe war von Kotter (53), Götze und Dialili-Afchar (33), Gemmer und Seeger (35), Großklaus (38) und Levetzow (61) schon lange gefordert und vor-geschlagen worden.

Der sogenannte allgemeine Hemmstofftest des Bundesgesundheitsamtes (AHT nach BGA) beruht auf einer Empfehlung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS) und des Bundesgesundheitsamtes (Levetzow (61)).

In der Verordnung ist die Durchführung des Testes genau geregelt und standardisiert. Sie bestimmt den Nährboden, den Testkeim, das Behandeln und Aufbringen der Proben, die Bebrütungszeit und diverse Auswertungskriterien.

Folgende Zusammensetzung des Nährbodens wird vorgeschrieben:

Rp.	Fleischpepton	3,45
	Caseinpepton	3,45
	Natriumchlorid	5,1
	Agar - Agar	13,0
	Aqua dest.	1000,0

Der pH-Wert für die Parallelansätze von pH 6,0 und pH 8,0 ist mit Natronlauge beziehungsweise Salzsäure einzustellen. Der Nährboden kann auch als Fertignährboden von der Firma Merck (Artikelnummer 10 663 und 10 664) bezogen werden.

Der Testkeim ist *Bacillus subtilis* BGA. Auf einen Liter Nährboden werden 1 ml Sporensuspension (Merck - Artikelnummer 10 649) mit einem Gehalt von 10 Millionen Sporen zugesetzt. 15 ml davon werden in eine Petrischale von 10 cm Durchmesser so ausgegossen, daß eine gleichmäßige Schichthöhe des Agars von 2 mm entsteht.

Als Proben sind ein Fleischstück und eine Niere steril zu entnehmen. Müssen die Proben verschickt werden, so sind sie gekühlt einzusenden. Die Stücke werden bei -20°C gefroren und mit einem sterilen Korkbohrer von 8 mm Durchmesser als Zylinder ausgestanzt. Von diesen Skelettmuskel- und Nierenmarkzylinderchen werden nun zwei etwa 2 mm starke Scheibchen abgeschnitten und gefroren auf je eine Hemmstofftestplatte von pH 6,0 und pH 8,0 gelegt, 18 bis 24 Stunden bei 30°C bebrütet und dann abgelesen.

Eine sichtbare (auch oberflächliche) Hemmung des Keimwachstums von mehr als 2 mm vom Rand der Probe aus gemessen, gilt als positiv, eine Hemmung von 1 - 2 mm ist als zweifelhaft anzusehen. Zeigt nur die Niere einen positiven Hemmhof, so sind die Organe untauglich für den menschlichen Genuß. Ist auch die Muskelprobe positiv, so wird der ganze Tierkörper als untauglich befunden. Zweifelhafte Ergebnisse werden nicht berücksichtigt. Der Fall, daß nur die Muskulatur eine Hemmung zeigt, ist in den Ausführungsbestimmungen nicht vorgesehen, also können weder Organe, noch der Tierkörper selbst gemäßregelt werden.

VIII. ZUVERLÄSSIGKEIT DES ALLGEMEINEN HEMMSTOFFTESTES - EINFLUSS VON KONTAMINATIONSBAKTERIEN

Schaper (83) fand bei 15 untersuchten Schweinen und 6 Kälbern nur

Hemmhöfe bei der Muskulatur. Wenzel (109) hatte bei 16 Schweinen und 14 Kälbern positive Muskelproben. Nach Gisske u.A. (36) waren bei 55 positiven Rindern nur in 61,8 % der Fälle Hemmstoffe in der Niere nachzuweisen. Nach dem Ausschluß methodischer Fehler suchen die Autoren eine Erklärung für dieses scheinbar paradoxe Phänomen; das der allgemeine Hemmstofftest einfach ignoriert. Nach ihrer Meinung kommt es bei therapeutischen Dosen eines Antibiotikums schnell zu einem hohen Blutspiegel und ebenso schnell zu einer Ausscheidung, wobei die Konzentration von der Niere über die Leber zur Muskulatur abnimmt. Bei Antibiotika mit protrahierter Ausscheidung, die über längere Zeit gegeben werden, komme es zu einer gleichmäßigen Verteilung im Gewebe, ja geringer Zunahme in Leber und Muskulatur. So wäre es durchaus denkbar, daß in der Muskulatur noch Antibiotikaresten zu finden sind, während in der Niere die Konzentration bereits unter das Nachweisniveau gefallen sei. Wenzel (109) meint, daß Organveränderungen zu Störungen im Ausscheidungsmechanismus führen können. Ferner weist er auf hohe und lange nachweisbare Konzentrationen von Hemmstoffen an einer Injektionsstelle hin, worauf auch Sinell (95) aufmerksam machte. Roth (79) kritisierte die Bewertung nach dem Hemmradius. Bei der Bebrütung könnte sich das Probestückchen verbreitern, sodaß mit dem gemessenen Abstand Probenrand - Hemmhofrand ein zu kleiner Wert ermittelt werde. Er schlägt als Bewertungsgröße den Hemmhofdurchmesser, abzüglich des ursprünglichen Probendurchmessers vor. Dieser Wert ist vom Zerfließen der Probe unabhängig.

Wenzel (109) fordert zur Erfassung aller hemmstoffpositiven Tiere mindestens zwei verschiedene Testkeime zu verwenden. In seinen Untersuchungen verwendete er *Bacillus subtilis*, *Bacillus*

cereus und Staphylococcus aureus und fand 30,3 % hemmstoffpositive Rinder und 9,1 % hemmstoffpositive Schweine. Bei alleiniger Verwendung von Bacillus subtilis als Testkeim hätte er nur 24,2 % positive Rinder und 6,7 % positive Schweine entdeckt.

Beck und Mantel (7) stellten fest, daß Bacillus subtilis BGA nicht auf alle Antibiotika gleichmäßig ansprachen. Obwohl sie bei 5 Kälbern, die vor ihrem Exitus mit therapeutischen Dosen Chloramphenicol behandelt wurden, nur einen hemmstoffpositiven Fall fanden, lasten sie dieses Ergebnis nicht dem Hemmstofftest, sondern den besonderen Resorptionsverhältnissen des Chloramphenicols an. Ebenso verhalte es sich mit Erythromycin.

Brüggemann u.A. (15) sind der Meinung, daß der allgemeine Hemmstofftest zu einer Diskriminierung leicht nachweisbarer Antibiotika führt. Sie konnten damit Tylosin, Erythromycin und Chloramphenicol im Fleisch von Tieren, die therapeutische Dosen erhalten hatten, nicht nachweisen. Die auftretenden unspezifischen Hemmungen bei Organproben führten sie auf mikrobielle Verunreinigungen der Proben zurück und fordern den Ausschluß aller mikrobiologisch kontaminierter Proben.

Levetzow und Weise (62) schreiben: "Durch verschiedene Bakterienarten und ihre Stoffwechselprodukte wird der Teststamm Bacillus subtilis BGA in seinem Wachstum negativ beeinflusst, so daß es zu einer (meist unregelmäßigen) Hemmzonenausbildung kommen kann. Dieser Vorgang ist nicht in allen Fällen und nur ausnahmsweise durch Antibioseversuche mit Reinkulturen reproduzierbar. Aus diesem Grunde wurde in der Arbeitsanweisung festgelegt, daß sich stark keimhaltiges Untersuchungsmaterial nicht zur Untersuchung eignet. Letztlich ist die Beurteilung in das Ermessen des Untersuchers gelegt, da verbindliche Richtwerte nicht gegeben werden könnten."

Sie führen weiter an, daß Proben, bei denen um das Probestück zuerst ein Saum des Testkeimes wächst und dann der Hemmhof beginnt, als negativ beurteilt werden müssen, während eine doppelt konturierte Hemmzone (Hemmhof um Probe - Testkeimring - Hemmhof) als positiv gewertet und der Abstand Probe - Ring als Hemmradius gemessen wird. Eine zwingende Erklärung für beide Phänomene gibt es nicht, sie treten besonders im saueren Milieu (pH 6,0) auf.

Schaal (83) stellt bei seinem Hemmstofftest mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) und *Bacillus cereus* als Testkeim bei beginnenden Fäulnisvorgängen am Untersuchungsmaterial unspezifische Eigenhemmung fest, die durch Erwärmung der Proben verhindert werden kann. Meyer u.A. (69) beziehen sich auf diese Aussage und führen die Eigenhemmung auf das Vorhandensein bestimmter Bakterien oder deren Stoffwechselprodukte zurück. Beck und Mantel (7) behaupten, daß weder durch Fäulnis noch durch Bakterien, bei fachlicher Beurteilung, falsche positive Werte hervorgerufen werden.

Über falsche negative Werte, z.B. beim Überwuchern eines Hemmhofes durch resistente Kontaminationsbakterien, fanden sich keine Angaben in der mir vorliegenden Literatur.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. HEMMSTOFFTEST

1.) Herkunft der Proben

Es wurden Proben von 170 Krankschlachtungen in der Bakteriologischen Fleischuntersuchungsstelle am Städtischen Schlachthof München untersucht. Eine Auswahl nach bestimmten Gesichtspunkten wurde nicht getroffen, sondern es wurden wahllos Proben von den nach § 27 (1) der AB.A zu untersuchenden Fällen genommen. Verwendet wurden allerdings nur frische Proben aus der Schlachthalle und aus dem Sanitätsschlachthaus, damit für alle Untersuchungen die gleichen Voraussetzungen hinsichtlich Gewinnung, Transport, Lagerung und damit auch der Kontaminationsmöglichkeiten gegeben waren. Ferner wurde die Nummer des Falles im Register der Untersuchungsstelle (BU-Nummer), Tierart und pathologisch-anatomischer Befund des Fleischbeschautierarztes notiert. Eine Zusammenstellung über Tierart und Erkrankungen gibt Tabelle III.

2.) Testmethodik

Es wurde der standardisierte allgemeine Hemmstofftest nach den Vorschriften der Verordnungsänderung der AB.A vom 18. Dez. 1973 durchgeführt (103).

Je Fall wurden drei etwa pflaumengroße Stücke Muskulatur und Niere von den zur Bakteriologischen Fleischuntersuchung gebrachten Proben entnommen und jeweils ein Stück Muskulatur und eine Nierenprobe für Test a, b, und c in eine sterile Kunststoffpetrischale gelegt.

Test a.) Die Proben wurden sofort bei -20°C gefroren. Anschließend stanzte ich aus den Fleischstückchen und dem Nierenmark

mit einem Korkbohrer, (in Brennschmelze getaucht und abgeflammt) Zylinder aus. Mit einem Skalpell entnimmt man aus dessen Mitte vier ca. 2 mm dicke Scheibchen. (Die beiden Endstücke des Zylinders sind wegen der vermehrten Kontaminationsmöglichkeit unbrauchbar). Die abgetrennten Scheibchen legte ich auf die Hemmstofftestplatten. Je zwei Platten von pH 6,0 und pH 8,0 beschickte ich mit Muskel- und Nierenproben. Die Platten waren dreifach unterteilt, sodaß pro Platte drei Fälle zur Auswertung kamen. Dann wurde jeweils eine Platte von pH 6,0 und pH 8,0 bei +37°C 20 Stunden bebrütet und die Ergebnisse abgelesen. Zu diesem Zweck benützte ich ein Stereomikroskop und eine durchsichtige Schablone mit Millimetereinteilung, damit ich den Hemmstoffradius auf 1/10 mm genau bestimmen konnte.

Test b.) Die Proben wurden in der geschlossenen Petrischale 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt und danach bei -20°C gefroren und weiter wie bei Test a verfahren.

Test c.) Die Proben wurden 24 Stunden bei 20 - 22°C Zimmertemperatur gelagert und dann wie bei Test a und b weiterverarbeitet.

Verwendeter Agar: Testagar für den allgemeinen Hemmstofftest (Merck, Artikel-Nrs. 10 663 und 10 664).

Zusammensetzung:

Spezialpepton	6,9 g
Natriumchlorid	5,1 g
Agar-Agar	13,0 g
Aqua dest.	1 000,0 g

3.) Ergebnisse

Insgesamt kamen 57 Kälber, 11 Bullen, 2 Rinder, 28 Kühe, 58 Schweine, 12 Schafe und 2 Pferde zur Untersuchung. Davon zeigten in wenigstens einem der beschriebenen 6 Testansätze 8 Kälber (14 %), 17 Schweine (29 %), 1 Bulle (9 %), 1 Kuh (4 %) und beide

Pferde (100 %) einen Hemmhof von mehr als 2 mm. Die Hemmung war meist um eine Nierenprobe ausgebildet, jedoch gab es auch Fälle, wo beide Nieren bei pH 6,0 und pH 8,0 positiv waren. Positive Muskelbefunde konnten bei den durchgeführten Untersuchungen nicht erhoben werden. Alle Proben bei Rindern und Schafen waren negativ. Eine genaue Differenzierung der positiven Ergebnisse bringt Tabelle IV und IV a.

Im Ergebnis zeigt sich hier eine ähnliche Verteilung der Fälle wie bei Tabelle II, nämlich ein erhöhter Anteil hemmstoffpositiver Schweine, wie er in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde. Der hundertprozentige Anteil an hemmstoffpositiven Pferden erklärt sich aus der geringen Zahl der untersuchten Tiere, die keine statistische Aussage zuläßt.

Tabelle III

Zusammenstellung der Fleischbeschaubefunde

Tierart/ Anzahl	Patholog.-anatom. Diagnose	Fälle ⁺	Organkomplex	Fälle ⁺
KALB 57	Leberabszeß	1	Leber	1
	Pneumonie	55	Lunge/	56
	Pleuritis	1	Brustfell	
	Niereninfarkt	1	Niere	21
	petechiale Blutungen	20		
	Enteritis	1	Darm/	1
	Peritonitis	1	Bauchfell	1
	Gonitis	1	Gelenke	1
KUH 28	Leberschwellung	5	Leber	8
	Leberabszeß	3		
	eitrige Pneumonie	1	Lunge/	2
	" Pleuritis	1	Brustfell	
	Endocardblutungen	1	Herz	1
	Niereninfarkt	1	Niere	5
	Nierenblutung	1		
	Nierenschwellung	3		
	Enteritis	1	Darm	5
	Proctitis	1		
	Peritonitis	2		
	Tympanie	1		
	Metritis	2	Gebärmutter	7
	Pyometra	4		
	Dunstkalb	1		
	Milzabszeß	1	Milz	1
	Mastitis	4	Euter	4
	Gonitis	2	Knochen/Gelenke/	7
	Panaritium	2	Muskulatur	
	Tarsitis	2		
	Abszeß im re. Schlegel	1		
	eitrige Konjunktivitis	1	Auge	1

Tierart/ Anzahl ⁺	Patholog.-anatom. Diagnose	Fälle ⁺	Organkomplex	Fälle ⁺
RIND 2	Pneumonie	1	Lunge	1
	Abszesse im Tier- körper	1	Muskulatur	1
PFERD 2	Volvulus	1	Darm	1
	Fraktur (hinten links)	1	Knochen	1
BULLE 11	Leberzirrhose	1	Leber	1
	Pneumonie	4	Lunge/Brustfell	6
	Pleuritis	2		
	Pericarditis	1	Herz	2
	Endocarditis	1		
	Nephritis	1	Niere	2
	Nierenblutung	1		
	Enteritis	1	Darm/Bauchfell	3
	Peritonitis	2		
Gonitis	3	Gelenke	3	
SCHWEIN 58	Leberschwellung	1	Leber	3
	Hepatitis	1		
	Leberzirrhose	1		
	eitrige Pleuritis	8	Lunge	29
	Pneumonie	16		
	Lungenabszeß	3		
	Abszeß in der Brust- höhle	1		
	Pericarditis	1	Herz	1
	Nephritis	3		
	Nierenblutung	2		
	Niereninfarkt	2		
	Niere vereitert	1		
	eitrige Peritonitis	4	Bauchfell/Darm	10
	Bauchhöhlenabszeß	5		
	Tympanie	1		
	Abszeß in der Milch- drüse	1	Gesäuge	1

Tierart/ Anzahl ⁺	Patholog.-anatom. Diagnose	Fälle ⁺	Organkomplex	Fälle ⁺
SCHWEIN	Wirbelabszeß	4	Knochen/	24
	Beckenabszeß	5	Gelenke/	
	Schwanznekrose	3	Muskulatur	
	Gonitis	4		
	Tarsitis	1		
	Gelenkabszeß	1		
	multiple Weichteil- abszesse	3		
	Phlegmone Schulter li.	1		
	jauchige Wunde	1		
	Kastrationsabszeß	1		
	ohne Angabe	1	ohne Angabe	1
SCHAF 12	Pneumonie	6	Lunge/Brustfell	8
	Pleuritis	1		
	Lungenabszeß	1		
	eitrige Nephritis	1	Niere	1
	Gonitis	5	Gelenke	5

⁺Die in Spalte 1 genannte Anzahl stimmt mit den in Spalte 3 und 5 genannten Fällen nicht überein, da bei der Fleischschau bei den einzelnen Tieren mehrere Befunde erhoben wurden.

Tabelle IV

Ergebnisaufschlüsselung bei positivem Hemmstofftest

Tierart	Test a		Test b		Test c	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
Kalb	N6N8	N6N8	N6N8	N8	K	K
"	N8	N8	N8	N8	K	KN6N8
"	KN6N8	KN6N8	n6N8	N6N8	K	KN6N8
"	N8	N8	n8	n8	K	K
"	N6	-	K	K	K	K
"	n6N8	n6N8	n6N8	n6N8	KN8	Kn6N8
"	N6	N6	N6	N6	K	K
"	-	-	N6	-	K	K
Kuh	N6N8	N6N8	N8	N8	K	K
Bulle	-	KN8	-	N8	K	K
Pferd	N6N8	N6N8	N6N8	N6N8	N6N8	N6
"	N8	N8	-	n8	N8	N8
Schwein	N8	N8	-	N8	K	K
"	N8	N8	K	-	K	K
"	N8	-	-	n8	K	K
"	N8	N8	N8	N8	K	K
"	N8	-	-	n8	K	K
"	-	-	-	N8	K	K
"	N8	-	n8	-	-	n8
"	N8	N8	N8	N8	N8	N8
"	N8	N8	N8	n8	K	K
"	N6	-	-	-	-	-
"	N8	n8	K	-	K	K
"	N6N8	N6N8	N6N8	N6N8	N6N8	N6N8
"	N8	K	N8	-	K	K
"	N8	n8	N8	n8	K	K
"	n8	-	N8	n8	K	K
"	N8	N8	n8	n8	K	K
"	N8	n8	n8	n8	K	K

Erklärung der Symbole

- N6 bzw. N8 Hemmhof größer als 2 mm um die Nierenprobe bei pH 6,0 bzw. pH 8,0, positiv zu werten.
n6 bzw. n8 Hemmhof kleiner als 2 mm um die Nierenprobe bei pH 6,0 bzw. pH 8,0, jedoch deutlich zu erkennen, Bewertung fraglich = negativ.
KN6 bzw. KN8 Kontaminationsring um Probe, Hemmhof vorhanden und größer als 2 mm, negativ zu werten.
K Kontaminationsbakterien und keine Hemmzone festzustellen, negativ.

Die Tabelle IV kann man nach den gesetzlichen Vorschriften des allgemeinen Hemmstofftestes auswerten und dabei nur die Symbole + für positiven und - für negativen, fraglichen und stark kontaminierten Test verwenden. Nach diesen Gesichtspunkten wurde die folgende vereinfachte Tabelle IV a aufgestellt.

Tabelle IV a

Tierart	Test a		Test b		Test c	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
Kalb	+	+	+	+	-	-
"	+	+	+	+	-	-
"	-	-	+	+	-	-
"	+	+	-	-	-	-
"	+	-	-	-	-	-
"	+	+	+	+	-	-
"	+	+	+	+	-	-
"	-	-	+	-	-	-
Kuh	+	+	+	+	-	-
Bulle	-	-	-	+	-	-
Pferd	+	+	+	+	-	+
"	+	+	+	+	+	+
Schwein	+	+	-	+	-	-
"	+	+	-	-	-	-
"	+	-	-	-	-	-
"	+	+	+	+	-	-
"	+	-	-	-	-	-
"	-	-	-	+	-	-
"	+	+	-	-	-	-
"	+	+	+	+	+	+
"	+	+	+	-	-	-
"	+	-	-	-	-	-
"	+	+	+	+	+	+
"	+	-	+	-	-	-
"	-	-	+	-	-	-
"	+	+	-	-	-	-
"	+	-	-	-	-	-

II. KONTAMINATIONSBAKTERIEN

1.) Herkunft der Bakterien und Gewinnung von Reinkulturen

Zuerst wurden von verschiedenen, bebrüteten Hemmstofftestplatten der unter I. HEMMSTOFFTEST aufgeführten Versuche Kontaminationsbakterien, die auf Fleisch- und Nierenproben auftraten, entnommen. Später wurden beliebige Hemmstofftestplatten der Bakteriologischen Fleischuntersuchungsstelle herangezogen. Dabei wurde kein Unterschied zwischen von auswärts eingesandten Proben und denen aus dem Schlachthof München gemacht. Es wurden von jedem Fall BU - Nr. und pathologisch-anatomischer Befund des Fleischbeschautierarztes notiert. Bevorzugt wurden Proben mit geringen Hemmhöfen, die wegen mikrobieller Verunreinigungen nicht auswertbar waren, bzw. es wurden bei positiven Proben etwa vorhandene Kontaminationsbakterien von dem korrespondierenden negativen Muskel- oder Nierenstückchen abgeimpft. Die Bakterien wurden mit einer sterilen Öse am Rande der Fleisch- oder Nierenstückchen entnommen, auf einer Agarplatte (Standard II - Nähragar Merck) ausgestrichen und 24 Stunden bei $+37^{\circ}\text{C}$ bebrütet. Danach wurden sie auf Schrägagarröhrchen (Standard II - Nähragar) überimpft und nach Gram gefärbt. Da es sich durchwegs um Mischkulturen handelte, wurde über mindestens 3 Passagen gereinigt. Insgesamt wurden von verschiedenen Fällen 134 Reinkulturen gewonnen.

2.) Untersuchungsmethoden

Die isolierten Stämme wurden auf einem Objektträger in einem Tropfen sterilem destilliertem Wasser verrieben, die gut luftgetrockneten Präparate durch dreimaliges Durchziehen in der nicht leuchtenden Bunsenflamme fixiert und nach der amerikanischen Modifika-

tion der Gramschen Färbemethode gefärbt (96).

Färbevorschrift:

- mit Ammoniumoxalatkrystallviolett-Lösung 1 Min. färben.
(Kristallviolett 2 g + Ammoniumoxalat 0,8 g + Äthylalkohol 95 %ig 20 ml + Aqua dest. 80 ml)
- Abspülen mit Wasser 2 Sek.
- Jodgoldsche Lösung 1 Min. einwirken lassen.
(Jod 1 g + KCl 2 g + Aqua dest. 300 ml)
- Abspülen mit Wasser, abtrocknen.
- Entfärben mit Alkohol 95 % 30 Sek., abtrocknen.
- Gegenfärbung mit Safraninlösung 10 Sek.
(2,5 %ige Safraninlösung in 95 % Alkohol 10 ml + Aqua dest. 100 ml)
- Abspülen, abtrocknen.

Nach dieser Färbung und mikroskopischer Prüfung auf Reinkultur wurden die Bakterien differenziert in gramnegative Stäbchen, grampositive Kokken und grampositive Stäbchen (auch Sporenbildner).

a.) Differenzierung der gramnegativen Bakterien

Zunächst wurden die Keime auf Endoagar für 24 Stunden bei + 37°C bebrütet. Die Gasbildung wurde bei derselben Temperatur in Gentianaviolett-Galle-Lactose-Peptonbouillon nach fünftägiger Bebrütung notiert. Weiters erfolgten die Untersuchungen auf Indolbildung (Kovacs Reagenz als Indikator), auf die Verwertung von Zitrat als einziger C-Quelle (94) und das Verhalten in Eisen III-Zucker-Harnstoff-Agar (1), einer Modifikation eines bereits früher entwickelten Nährbodens (48). Außerdem wurden sämtliche Kulturen vorher der sog. Schnellkatalase mit einer 3 %igen Wasserstoffperoxidlösung unterzogen. Die Ergebnisse erlaubten neben der Auswertung der Voges-Proskauer'schen Reaktion auf Acethylmethylcarbinol und dem Methylrottest (68), sowie dem Nachweis des Abbaues von Mannit, Sorbit, Inosit, Rhamnose und Arabinose (Filterblättchenmethode) eine einwandfreie Differenzierung der gewonnenen Reinkulturen. Aus Gründen einer weiteren

Differenzierung wurde auch noch der Nachweis auf den Abbau bzw. auf die Hydrolyse von Gelatine, Stärke, Casein und Tributyrin durchgeführt.

Ein rotgefärbter Keim (vermutet wurde *Serratia marcescens*) konnte nach der pH-Reaktion des alkoholischen Auszuges dieser Kultur einwandfrei und schnell nachgewiesen werden.

b.) Differenzierung der grampositiven Bakterien

Die grampositiven Keime wurden ebenfalls auf Katalasebildung, auf Gelatine-, Casein- und Stärkeabbau geprüft, daneben wurde die Reaktion auf Acethylmethylcarbinol, auf Säurebildung mittels Methylrot und die Reduktion von Nitrat untersucht (68). Außerdem wurde auf Harnstoffabbau (26) und auf Verhalten in Lackmusmilch geprüft. Nach dem Ausfall dieser Vordifferenzierung wurde weiteruntersucht: Auf Fäkalstreptokokken auf dem sog. KF-Agar (44) bei Mikro- und Staphylokokken auf dem Selektivagar nach Baird-Parker (2) und im sog. OF-Test (3). Hier schloß der Koagulasetest an. Die Sporenbildner, ausschließlich Genus *Bacillus* wurden nach Bartholomew und Mittwer (6) gefärbt und nach den heute verbindlichen Untersuchungsverfahren (8) differenziert.

3.) Ergebnisse

Zur Bestimmung dienten die Angaben der achten Auflage von Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8). Außerdem wurden zur genaueren Differenzierung der Spezies folgende Autoren herangezogen:

Baird-Parker (3)
Cowan and Steel (25)
Carpenter u.A. (22)
Harrigan and McCance (39)
Schmidt-Lorenz (86)
Müller (71) und
Kundrat (57)

Es wurden folgende Keime gefunden:

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Ps. aerug.)	2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Ps. fluor.)	24
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	(Ps. putr.)	2
<i>Escherichia coli</i>	(E. coli)	17
(davon 11 Warmblutcoli)		
<i>Citrobacter freundii</i>	(Citr. fr.)	6
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(Ent. aer.)	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	(Ent. cloac.)	5
<i>Hafnia alvei</i>	(Haf. alvei)	1
<i>Serratia marcescens</i>	(Serr. marc.)	1
<i>Proteus vulgaris</i>	(Pr. vulg.)	5
<i>Proteus mirabilis</i>	(Pr. mir.)	6
<i>Micrococcus ssp.</i>	(M. ssp.)	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	(Staph. aur.)	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(Staph. epi.)	6
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	(Staph. sap.)	18
<i>Streptomyces ssp.</i>	(Strep. ssp.)	1
<i>Lactobacillus brevis</i>	(Lact. br.)	2
<i>Brevibacterium ssp.</i>	(Brev. ssp.)	12
<i>Bacillus sphaericus</i>	(Bac. sph.)	2
<i>Bacillus licheniformis</i>	(Bac. lich.)	1
<i>Bacillus pasteurii</i>	(Bac. past.)	1

III. PRÜFUNG DER ISOLIERTEN KEIME AUF EIGENE HEMMSTOFF-BILDUNG

1.) Testmethodik:

Zur Verwendung kam der oben bereits beschriebene Agar für den Hemmstofftest BGA mit dem in der üblichen Weise zugesetzten Sporengemisch von *Bacillus subtilis* im Doppelansatz bei pH 6,0 und pH 8,0. Die vorbereiteten Platten wurden folgendermaßen beimpft: Eine Schablone, auf der in regelmäßigen Abständen schwarze Punkte von 8 mm Durchmesser aufgezeichnet waren, diente als Unterlage für die Petrischalen. Über den schwarzen Punkten, die durch den Agar schienen, strich ich jeweils einen Stamm so aus, daß die Impfstelle etwa 8 mm Durchmesser hatte. Nach

18 Stunden Bebrütung bei 30°C wurden die Platten im durchscheinenden Licht untersucht und auftretende Hemmhöfe gemessen.

2.) Ergebnisse

Von den untersuchten Stämmen zeigten 18 eigene Hemmstoffbildung gegenüber *Bacillus subtilis* BGA. 2 Stämme ließen geringe, gerade wahrnehmbare Hemmung erkennen, 5 bildeten auf mindestens einer Platte einen Hemmhof unter 2 mm und 11 Stämme produzierten eine wachstumsfreie Zone, die größer als 2 mm war. Verteilung der Fälle und Hemmhofgröße:

a.) geringe Hemmung:

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2 Fälle
--------------------------------	---------

b.) Hemmhof kleiner als 2 mm:

<u>Spezies</u>	<u>Radius der Hemmhöfe in mm</u>	
	bei pH 6,0	bei pH 8,0
<i>Bacillus licheniformis</i>	0,5	-
<i>Brevibacterium ssp.</i>	1	1
" "	0,5	1
" "	2	-
" "	1	-

c.) Hemmhof größer als 2 mm:

<u>Spezies</u>	<u>Radius der Hemmhöfe in mm</u>	
	bei pH 6,0	bei pH 8,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2	2
" "	1	3
" "	2	4
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	4	5
" "	8	7
<i>Serratia marcescens</i>	2	1
<i>Brevibacterium ssp.</i>	0,5	2
" "	2	3
" "	3	3
" "	1	2
" "	1	2

Insgesamt verteilten sich die Hemmstoffbildner auf die einzelnen Spezies wie folgt:

	<u>Anzahl positiver Stämme</u>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	2
<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Brevibacterium ssp.</i>	9
<i>Bacillus licheniformis</i>	1

Tabelle V zeigt eine Zuordnung der einzelnen Stämme zu den Entnahmefällen, die rechtsverbindliche Bewertung der Fälle im allgemeinen Hemmstofftest durch die Bakteriologische Untersuchungsstelle und die Hemmstoffbildner unter den bisher unvermeidbaren Begleitkeimen.

Tabelle V

Spezies	eigene Hemm- stoff- bild.	Tier- art	Vorbericht	Ergebnis im AHT
Ps. aerug.	-	K	Metritis, Abszeß im re. Schlegel	+
" "	-	B	Pneumonie	-
Ps. fluor.	-	Ka	Tympanie	++
" "	-	Ka	Pneumonie	+
" "	-	Ka	"	-
" "	-	Ka	"	+
" "	-	K	Leberschwellung, Metritis	-
" "	h	K	Haemorrhag. Enteritis, innere Blutungen	++
" "	-	K	Fleckniere	-
" "	H	K	Endometritis n. Totgeburt	+
" "	-	K	Hepatitis, Nephritis, Mastitis	-
" "	H	K	Tympanie	-
" "	-	K	Peritonitis	-
" "	-	R	Tympanie	-
" "	H	R	Pneumonie	-
" "	-	R	haemorrhag. Enteritis	-
" "	-	R	Bronchopneumonie	++
" "	-	S	Festliegen, Schwanznekrose	-
Ps. putr.	H	K	haemorrhag. Enteritis, innere Blutungen	++
" "	H	B	Tarsitis	-
E. coli	-	Ka	Tympanie	-
" "	-	Ka	eitr. Pneumonie	-
" "	-	Ka	Tympanie	++
" "	-	Ka	Pneumonie, Nierenblutung	-
" "	-	Ka	eitr. Pneumonie	-
" "	-	Ka	Gonitis bds.	-
" "	-	K	Volvulus	+
" "	-	K	Festliegen, Mastitis	++
" "	-	K	Mastitis	+
" "	-	K	Peritonitis	+
" "	-	K	Pyometra	++
" "	-	S	Enteritis, Peritonitis	+
" "	-	S	Nephritis	+
" "	-	S	Wirbelabszeß	+
" "	-	S	Pneumonie	+
" "	-	P	Endocardblutung, Herzinfarkt	+
Citr. fr.	-	Ka	eitr. Pneumonie	-
" "	h	K	haemorrhag. Enteritis, innere Blutungen	++
" "	-	K	Tympanie	-
" "	h	B	Tarsitis	-

Spezies	eigene Hemm- stoff- bild.	Tier- art	Vorbericht	Ergebnis im AHT
Ent. cloac.	-	Ka	Peritonitis	-
" "	-	K	Metritis, Peritonitis	-
" "	-	S	Kollaps, fettige Leber- degeneration	++
" "	-	S	Festliegen, Metritis	++
" "	-	S	Totfrüchte, Schweregeburt	+
Ent. aer.	h	K	haemorrhag. Enterit., innere Blutungen	++
Haf. alvei	-	K	Mastitis	+
Serr. marc.	-	B	Tarsitis	-
Pr. vulg.	-	K	Festliegen, Tarsitis	+
" "	h	B	Tarsitis	-
" "	-	S	Geburstrauma, Prolaps uteri	+
Pr. mir.	-	K	Peritonitis	-
" "	-	K	Uterusruptur nach Schweregeb.	+
" "	-	K	Nephritis	++
M. ssp.	-	Ka	Pneumonie	-
" "	-	Ka	Pneumonie	+
" "	-	Ka	Leber- u. Milzschwellung	++
" "	-	Ka	Pneumonie	-
" "	-	K	ohne Angabe	+
" "	h	K	Gefäßzerreißung Oberschen- kel li.	+
" "	-	K	Tympanie	-
" "	-	"	Uterusruptur	-
" "	-	"	Tympanie	-
" "	-	"	Metritis	-
" "	h	K	Pneumonie	-
" "	-	K	ohne Angabe	+
" "	-	S	Nephritis, Pneumonie, Wirbelabszess	+
" "	-	S	eitr. Pneumonie	-
" "	-	S	Pneumonie	+
" "	-	S	Festliegen, Lungenabszess	+
" "	-	S	Arthritis	+
Staph. aur.	-	K	Herzversagen nach Uterusprol.	+
" "	-	K	Tympanie	+
" "	-	S	Nephritis, Pneumonie, Wirbelabszess	+
Staph. epi.	-	K	Fremdkörperverwachsungen	-
" "	-	K	Tympanie	-
" "	-	K	Herzversagen nach Uterusprol.	+
" "	-	K	Metritis	-
" "	h	K	haemorrhag. Enteritis, innere Blutungen	++
" "	-	K	Tympanie	-
" "	-	B	Fremdkörperperitonitis	-

Spezies	eigene Hemm- stoff- bild.	Tier- art	Vorbericht	Ergebnis im AHT
Staph. sap.	h	Ka	Kolik, blutige Inhibition am Unterbauch	-
" "	-	Ka	Pneumonie	+
" "	-	Ka	Tympanie	+
" "	-	K	ohne Angabe	+
" "	-	R	Tympanie	-
" "	-	R	Pneumonie, Pericarditis	-
" "	-	R	Oesophagusstenose, Tympanie	-
" "	-	R	Tympanie	-
" "	-	O	Pneumonie	-
" "	-	S	eitr. Tarsitis	+
" "	-	S	jauchige Abszesse im Kopf	+
" "	-	S	Wirbelabszesse	+
" "	-	S	eitr. Pneumonie	-
Lact. br.	-	Ka	ohne Angabe	++
" "	-	Ka	Enteritis	++
Brev. sep.	-	Ka	Pneumonie, Nierenblutung	-
" "	H	Ka	eitr. Pneumonie	-
" "	H	Ka	Kolik, blutige Inhibition am Unterbauch	-
" "	H	Ka	Bauchverletzung	++
" "	H	Ka	Pneumonie	-
" "	-	K	Metritis	+
" "	H	K	Gefäßzerreißung am Oberschenkel	+
" "	-	S	Nephritis, Pneumonie	+
" "	H	S	eitr. Pneumonie	-
" "	H	P	Fraktur hinten li.	+
Bac. sph.	-	S	Leberschwellung	+
" "	-	S	Pneumonie	+
Bac. lich.	H	S	Leberv Verfettung	+
Bac. past.	h	K	haemorrhag. Enteritis	++

Zeichenerklärung:

- + bedeutet: Hemmhof bei der Nierenprobe größer als 2 mm
- ++ bedeutet: Hemmhof bei der Nieren- und Muskelprobe größer als 2 mm
- H bedeutet: Eigene Hemmstoffbildung des gefundenen Keimes
- h bedeutet: Hemmstoffbildung eines anderen beim gleichen Fall gefundenen Keimes

K = Kuh; Ka = Kalb; B = Bulle; R = Rind; O = Ochse; P = Pferd; S = Schwein.

Die Zahl der aufgezählten Keime ist geringer als oben angeführt, da von einigen Fällen mehrere Keime der gleichen Spezies gewonnen wurden, während manche Fälle mehrmals erscheinen, weil verschiedene Keime von ihnen isoliert wurden.

D. DISKUSSION

Der Hemmstofftest wurde nach den Vorschriften der Verordnungsänderung vom 18. Dez. 1973 zur AB.A durchgeführt (103). Da als Temperaturoptimum für *Bacillus subtilis* in der Literatur (Schaal (82), Schaper (83), Pichnarcik u.A. (75), Drews (29), Dedek u.A. (27), Nassal u. Nieper (72)) fast ausnahmslos + 37°C angegeben ist, würde zusätzlich eine Testreihe bei + 37°C bebrütet. Die Kolonien von *Bacillus subtilis* wuchsen bei höherer Bebrütungstemperatur dichter und die Grenze der Hemmhöfe war besser zu erkennen. Die Erhöhung der Temperatur auf die normale Optimaltemperatur übte natürlich keinen gesetzmäßig erfaßbaren Einfluß auf die Hemmhofgröße aus.

Die Aufbewahrung der Proben über 24 Stunden bei Kühlschrank- und Zimmertemperaturen sollte Transporteinflüsse simulieren. Wenn auch die Vorschrift besagt, daß alle Proben gekühlt in wärmeisolierten Behältnissen eingesandt werden müssen, fand ich es dennoch wichtig, auch ungekühlte Proben zu untersuchen. Zur Zeit der Durchführung der Versuche waren aus verwaltungstechnischen Gründen weder Kühlelemente noch Styroporkisten bei der Untersuchungsstelle vorhanden, sodaß vorerst nur ungekühlte Proben eingesandt werden konnten. Außerdem können Probenbehälter auf dem Transport beschädigt werden und es würden dann wieder ungekühlte Proben zur Anlieferung kommen.

Von 24 im allgemeinen Hemmstofftest (Bebrütungstemperatur + 30°C) positiven Fällen, konnten unter Zugrundelegung der Bewertungskriterien der AB.A nur noch 15 bei einer Bebrütungstemperatur

von + 37°C als hemmstoffhaltig gefunden werden. Die Proben für beide Versuche wurden aus dem gleichen ausgestanzten Fleisch- und Nierenmarkzylinder entnommen und gleichzeitig auf die vorbereiteten Platten gelegt. Eine Verwechslung oder methodische Fehler sind absolut auszuschließen. Dieses Ergebnis bedeutet aber eine Verminderung der positiven Fälle um 38 %. Die 9 als negativ zu beurteilenden Fälle teilen sich auf in 3 Proben mit einem Hemmhof unter 2 mm, eine zeigte Kontamination und 5 Proben keine erkennbare Hemmung mehr.

Ein Vergleich der Proben, die im Kühlschrank aufbewahrt wurden, zeigte, daß bei + 30°C Bebrütungstemperatur 16 positive Wertungen auftraten, bei + 37°C aber nur 11, das sind 31 % weniger. Dafür traten bei + 37°C positive Fälle auf, obwohl der Befund bei + 30°C negativ war.

Bei den ungekühlten Proben ergaben sich auf 3 positive Fälle bei + 30°C 4 bei + 37°C.

Es zeigte sich, daß mit dem standardisierten, allgemeinen Hemmstofftest bei einer Erhöhung der Bebrütungstemperatur um 7°C, was dem Optimum des Testkeims besser entspricht, zum Teil keineswegs übereinstimmende oder doch wenigstens vergleichbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Bei gleichem Ausgangsmaterial und gleicher Testmethodik ergab sich eine Streuung von über 30 %. Für diese Streuung konnte weder ein Fehler verantwortlich gemacht werden, noch wurde eine zwingende Erklärung gefunden. Eine Ausnahme in der Art, daß eben durch die Begrenzung der positiven Werte auf einen Hemmhof über 2 mm Radius, geringe Unterschiede der Radien (etwa zwischen 1,9 mm und 2,1 mm) eine Umkehrung der Wertung bedingen, kann nicht angenommen werden. Nicht einmal die Deutung, die

Proben seien wegen Kontaminationsbakterien nicht auswertbar, ist stichhaltig. Von insgesamt 18 positiven Fällen, bei denen die Parallelprobe negativ war, ergab sich als Grund für die negative Bewertung bei 6 ein Hemmhof unter 2 mm, bei 2 eine starke Kontamination und bei 10 Fällen ein Ausbleiben jeder Hemmung.

Bei der Durchführung des Hemmstofftestes mit Material, das verschiedenen Umwelteinflüssen ausgesetzt war und wie es täglich bei den einzelnen Untersuchungsstellen eingeliefert wird, zeigte sich: Auf 24 positive Ergebnisse bei den frischen, sofort angesetzten Proben kamen 13 positive von gekühltem, einen Tag altem Untersuchungsmaterial. Außerdem traten bei den gekühlten, 24 Std. aufbewahrten Proben drei positive Fälle auf, die bei frischem Material negativ waren.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Untersuchungen von Forschner (31), während Scheibner (84) fand, daß ein Teil seiner Proben nach Aufbewahrung bei Zimmertemperatur und bei +4°C eine deutliche Verminderung der Aktivität gegenüber dem Ausgangswert zeigten.

Beim Vergleich der Parallelproben konnten Kontaminationsbakterien nicht für eine Umkehrung der Wertung verantwortlich gemacht werden. Anders verhält es sich, wenn man die gelagerten Proben mit den frischen vergleicht. Dies tritt bei den gekühlt aufbewahrten nicht beweisend (von 11 gegenüber den frischen, negativen Proben waren 3 bakteriell stark verunreinigt, 4 hatten einen Hemmradius kleiner als 2 mm und 4 zeigten keinen Hemmhof), wohl aber bei den ungekühlt aufbewahrten deutlich zutage. Von den 24 bei frischem Ansatz positiven Proben mußten hier 21 negativ beurteilt werden, davon waren 2 ohne Hemmhof und ohne Kontamination, 2 hatten eine deutliche Hemmzone, waren aber mit Bakterien bewachsen. Bei 17 Fällen war auf Grund der üppig

um die Probenstückchen wachsenden Keime (bis zu einem cm im Radius) keinerlei Hemmhof feststellbar.

Die drei auch bei ungekühlt aufbewahrtem Material positiven Proben zeigten bei den verschiedenen Ansätzen Hemmhöfe von 3,7 mm bis 6,8 mm, 5,4 mm bis 7,9 mm und 5,9 mm bis 12,7 mm. Daraus ist zu schließen, daß nur Antibiotika, welche auf der BGA-Testplatte große Hemmzonen ausbilden, auch bei stark kontaminierten Proben nachweisbar sind. Das Ergebnis: Frische Probe: 24 Stunden gekühlte Probe: 24 Stunden ungekühlte Probe von 24 : 13 : 3 positiven Fällen zeigt, daß der allgemeine Hemmstofftest trotz Standardisierung nicht genügend reproduzierbar ist. Dies ist nicht weiter verwunderlich, denn bei diesem biologischen Test spielen einige dynamische Systeme zusammen, die sich schwer in ein starres Schema pressen lassen. Zum einen spielt die Wachstumsintensität des Testkeimes eine entscheidende Rolle. Zwar ist der Nähragar und die Keimeinsaat festgelegt, der *Bacillus subtilis* aber wird auf einer Platte, die zwei Tage im Kühlschrank gelagert wurde, (nach eigener Beobachtung) dichter wachsen als auf einer frisch gegossenen Platte; von Austrocknungserscheinungen des Agars ganz abgesehen.

Es ist weder aus organisatorischen Gründen, noch Kostenfragen möglich, von einer Untersuchungsstelle zu verlangen, jeweils frisch gegossene Platten zu verwenden. Ein weiterer dynamischer Faktor liegt in der Menge des austretenden Gewebesaftes. Eine geschwollene Niere wird sich anders verhalten, als eine normale, ein sehnereiches Muskelstück weniger Gewebesaft austreten lassen. Auch eine frische Probe wird, abgesehen von der bakteriellen Besiedelung, anders reagieren als eine überlagerte. Die verschiedenen Antibiotika haben unterschiedliche Diffusionsgeschwin-

digkeiten, d.h. ein großer Hemmhof läßt noch lange nicht auf hohe Antibiotikakonzentrationen schließen. Zu diesen vom Testmaterial abhängigen Faktoren kommen trotz genauer Festlegung der Arbeitsgänge, Unsicherheiten in der Ausführung und Bewertung des Testes. So betonen Pichnarcik u.A. (75) den Einfluß der Vordiffusion auf die Hemmhofgröße. Eine Person kann etwa 20 - 25 Proben in der Stunde ausstanzen und auflegen. Im Routinebetrieb ist es undenkbar, jede einzelne Platte sofort nach dem Belegen in den Brutschrank zu bringen. In der Annahme, daß die beschickten Platten jede Stunde in den Brutschrank verbracht werden, ergibt sich für Platte 1 eine Vordiffusion von 1 Stunde bei Zimmertemperatur, für Platte 25 aber keine. Bei gleichem Antibiotikum und gleicher Konzentration müßte Hemmhof 1 größer sein als Hemmhof 25. Da die Hemmhofgrößen von vielen, im Ganzen nicht immer überschaubaren Faktoren abhängig sind, ist es wichtig, keine willkürliche Millimeterangabe als Bewertungsgrenze zu nehmen, sondern wie in Holland (Nierentest von van Schothorst (91), mit *Sarcina lutea*) jede einwandfrei erkennbare Hemmung als positiv zu bezeichnen.

Aus den durchgeführten Untersuchungen ergeben sich zwei beachtliche Konsequenzen für den allgemeinen Hemmstofftest:

a.) Wird bei positivem Ausfall der Probe die gesetzlich zugebilligte Gegenprobe verlangt, so ist das Untersuchungsmaterial für die Nachuntersuchung mindestens 24 Stunden im Kühlschrank gelagert, d.h., es besteht zu etwa 50 % die Möglichkeit mit der Gegenprobe das Ergebnis der ersten Untersuchung in Frage zu stellen.

b.) Eine stark kontaminierte Probe senkt die Möglichkeit des

Hemmstoffnachweises beträchtlich. Es ergeben sich aus der Wertung "kontaminiert, nicht auswertbar" keine nachteiligen Konsequenzen für den Einsender.

Ein absolut steriles Arbeiten ist nicht möglich, schließlich beginnt die Gewinnung der Proben mit dem Schlachtvorgang. Selbst bei genauestem Vorgehen nach Vorschrift, Entnahme mit sterilen Instrumenten und entsprechender Weiterbehandlung ist eine Keimfreiheit des Fleisches oder der Nieren, die im Schlachthausmilieu gewonnen wurden, nicht zu erwarten. Es muß immer mit dem Auftreten von Bakterien gerechnet werden. Diese treten umso gehäuft auf, je älter die Probe ist und je wärmer sie gelagert wurde. Als Keime sind ubiquitäre Schmutzkeime zu erwarten, wie sie am Tierkörper, in Luft, Boden und Wasser vorkommen. Diese Vermutung wurde durch die vorliegende Untersuchung bestätigt. Insbesondere fallen hierbei die hohe Anzahl der *Pseudomonas* ssp. auf, typisch für die spezifische Flora des Feuchtbetriebes Schlachthaus.

Diese Keime sind meist in der Lage, die Probe und einen kleineren Hemmhof zu überwuchern und so bei vermutlich positivem Befund eine negative Wertung zu erzwingen. Nach Brandis und ^vSmarda (14) können fast alle der isolierten Keime Bacteriocine und bacteriocinähnliche Substanzen bilden. Es sind dies:

Pseudomonas aeruginosa
Pseudomonas fluorescens
Escherichia coli
Citrobacter freundii
Enterobacter aerogenes
Enterobacter cloacae
Hafnia alvei
Serratia marcescens
Proteus mirabilis
Proteus vulgaris
Staphylococcus aureus
Micrococcus ssp.

Während die Bacteriocine der gramnegativen Bakterien nur gegen

die gleiche Spezies oder gegen nahe verwandte Stämme des bacteriocinbildenden Keimes gerichtet sind, haben die Bacteriocine der grampositiven Bakterien ein breiteres Wirkungsspektrum. Mikrokokken und Staphylokokken sind in der Lage, Polypeptide zu bilden, die auf andere Bakterien einschließlich der Bacillaceae wirken. Außerdem können verschiedene Staphylokokkenstämme Lysozym bilden, das in der Lage ist, andere Bakterienarten am Wachstum zu hindern und die Kokken gegen Bacteriocine zu schützen. Auch verschiedene *Pseudomonas* ssp. hemmen *Bacillus subtilis*.

Es lag nahe, alle isolierten Stämme auf eigene Hemmstoffbildung auf der BGA-Testplatte zu prüfen. Dabei ergab sich, daß 13,4 % aller gefundenen Keime in der Lage waren, Hemmhöfe zu erzeugen. Der Radius der wachstumsfreien Zonen um die Kolonien reichte von kaum wahrnehmbar bis zur Größe von 8 mm. 25 % der Pseudomonaden, 75 % der Brevibakterien, 25 % des Genus *Bacillus* und der einzige Stamm von *Serratia marcescens* bildeten Antibiotika gegen *Bacillus subtilis*.

Um Fehlurteile auszuschließen ist zu fordern, daß alle bei positiven Proben im allgemeinen Hemmstofftest auftretenden Kontaminationskeime in der beschriebenen oder einer ähnlichen Weise auf eigene Hemmstoffbildung zu untersuchen sind, damit alle Fälle, bei denen Bakterien für den Hemmhof verantwortlich sind, von der Bewertung ausgeschlossen werden. Eine Unterscheidung in starke und geringe Kontamination, wie sie Levetzow (62) als Kriterium für einen hemmstoffbildenden Keim vorschlägt, halte ich für ungeeignet, zumal die Grenzen dieser Unterscheidung, wie Levetzow selbst sagt, im Ermessen des Untersuchers liegen. Bei Levetzows Ausführungen

ist nicht einzusehen, warum hemmstoffbildende Bakterien auf der Probe im Gegensatz zum in der Probe vorhandenen Antibiotikum einen unregelmäßigen Hemmhof ausbilden sollen.

Wie oben ausgeführt, ist die Gewinnung von keimfreiem Fleisch nicht möglich. Eine Abtötung von Keimen vor dem allgemeinen Hemmstofftest ist nicht ratsam, da entweder durch Erhitzung vorhandene Hemmstoffe verändert werden können oder durch chemische Desinfektionsmittel, die direkt auf die Probe gebracht werden, der Test beeinflusst werden kann. Da nun aber alle Proben als habituell kontaminiert anzusehen sind, wäre es das Beste, einen Test zu entwickeln, der nicht mehr von zufällig auf der Probe anwesenden Keimen gestört werden kann.

Als erste Möglichkeit, den Einfluß von Fremdkeimen auf den Hemmstofftest herabzusetzen, gilt es bei geeignetem Testkeim, die Bebrütungsdauer zu vermindern, um den Schmutzkeimen wenig Zeit zur Entwicklung und eventuellen Hemmstoffbildung zu geben. Dies fände zudem die Zustimmung aller Beteiligten, die an einer schnellen Auswertung des Testes interessiert sind. Des weiteren kann man versuchen, einen Testkeim zu finden, dessen Temperaturoptimum deutlich von dem der Kontaminationskeime verschieden ist. Es wäre auch daran zu denken, einen für den Testkeim selektiven Nährboden zu entwickeln. Zudem muß der Testkeim eine große Empfindlichkeit gegen möglichst alle in der Veterinärmedizin verwandten Antibiotika haben. Nach Kundrat (59) ist ein Keim umso antibiotikaempfindlicher, je schneller er sich vermehrt (also je höher seine Optimaltemperatur ist), d.h., es besteht eine Abhängigkeit zwischen Testzeit und Empfindlichkeit. Forschner (32) bevorzugt die Plättchenmethode um die Kontaminationsmöglichkeiten zu ver-

ringern und Psota (77) erhält damit sogar bessere Ergebnisse als mit Organproben.

Ein Schnelltest wurde von Nouws (73) beschrieben. Er verwendet *Bacillus subtilis* BGA, wobei er die Sporeneinsaat auf 10^9 Sporen/ml und die Bebrütungstemperatur auf 42°C erhöht. Das Ergebnis kann in 90 bis 120 Minuten abgelesen werden. Allerdings will der Autor diesen Test nur als Vorauswahl für den Nierentest nach van Schothorst (91) verstanden wissen.

Da eine Kontrolle der Schlachttiere auf Antibiotikarückstände zum Schutze unserer Gesundheit heute unerlässlich ist, gilt es, ein wirtschaftlich tragbares Verfahren, das den aufgestellten Forderungen für einen durch Fremdkeime unbeeinflussbaren Hemmstofftest möglichst nahekommst zu entwickeln und gesetzlich abzusichern. Dafür bietet sich z.Z. der 45 Minuten-Schnelltest mit *Bacillus stearothermophilus* bei 65°C Bebrütung im Blättchentest an. Durch die hohe Temperatur und geringe Testdauer ist hierbei ein steriles Arbeiten nicht erforderlich, was als zusätzliches Plus gewertet werden kann.

E. ZUSAMMENFASSUNG

- 1.) Es wurden 170 Krankschlachtungen auf Antibiotikarückstände am Städtischen Schlachthof München untersucht. Dabei wurden im Parallelversuch frische, 24 Stunden im Kühlschrank und 24 Stunden bei Zimmertemperatur gelagerte Proben geprüft.
- 2.) Bei einer Bewertung der Ergebnisse nach den Kriterien des "allgemeinen Hemmstofftestes BGA" verringerte sich die Zahl von 24 positiven Fällen bei frischen Proben auf 13 bei gekühlten und auf 3 bei ungekühlten für jeweils 24 Stunden aufbewahrten Proben.
- 3.) Von verschiedenen Fällen wurden 134 Stämme von Kontaminationskeimen, die beim Hemmstofftest auf den Proben auftraten, isoliert und bestimmt.
- 4.) Die isolierten Keime wurden auf eigene Hemmstoffbildung geprüft. 13,4 % aller gefundenen Keime hemmten *Bacillus subtilis* BGA. Es traten Hemmradien von kaum wahrnehmbar bis zu 8 mm auf.
- 5.) Es wird ein Hemmstofftest gefordert, der nicht von Kontaminationsbakterien beeinflusst werden kann.

S U M M A R Y

- 1.) 170 emergency-slaughtered animals had been examined of antibiotic residues at the "Städtischer Schlachthof München". On this occasion fresh test-material, material which had been stored in the refrigerator for 24 hours and material, which had been stored at room temperature for 24 hours was tested in a parallel experiment.
- 2.) An evaluation of the results according to criteria of the "allgemeine Hemmstofftest BGA" reduced the number of positive results of 24 fresh samples to 13 cooled ones and 3 uncooled ones stored for 24 hours.
- 3.) 134 bacteria-strains of different cases, which grew on the test-material of the inhibitory test had been isolated and determined.
- 4.) The isolated bacteria proved to produce inhibitory substances. 13,4 % of the bacteria found, inhibited the growth of *Bacillus subtilis* BGA. The inhibitory radiae ranged from a size hardly to be seen till 8 mm.
- 5.) An inhibitory-substances-test that cannot be altered by contamination bacteria is required.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Bader, R.E. und G. Hotz:
Eisen - Harnstoff - Agar, - eine Modifikation
des Eisen - Agars nach Kligler.
Z. Hyg. 133 (1951), 20;
2. Baird-Parker, A.C.:
An improved diagnostic and selective medium
for isolating coagulase positive Staphylococci
J. appl. Bact. 25 (1962), 12;
zitiert nach Schmidt-Lorenz (86);
3. Baird-Parker, A.C.:
Methods for classifying Staphylococci and
Micrococci.
In Gibbs, B.M. and F.A. Skinner:
Identification Methods for Microbiologists
Academie Press, London - New York 1966;
4. Bartels, H. Angersbach und H.J. Klare:
Nachweis von Hemmstoffen aus Normalschlach-
tungen.
Fleischwirtschaft 52 (1972), 479;
5. Bartels, H. und K. Gerigk:
Antibiotika in Fleisch
Fleischwirtschaft 44 (1964), 309;
6. Bartholomew, J.W. and T. Mittwer:
Stain Technol. 25 (1950), 153;
zitiert nach Kundrat (57);
7. Beck, G. und Th. Mantel:
Der biologische Hemmstofftest, ein Weg zur
Klärung des Rückstandsproblems im Fleisch.
Fleischwirtschaft 52 (1972), 1605;
8. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,
Eighth edition.
The Williams & Wilkins Company, Baltimore 1974;
9. Bethke, H.H. und J. Püschner:
Bericht über Antibiotika-Testbefunde bei
33 000 Schlachttieren,
Schlacht- und Viehhofztg. 6 (1972), 212;
10. Beyer, K.W., E. Bulling, G. Goldglück und R. Stephan:
Die Wirkung der Antibiotikabeifütterung in
nutritiven Dosen auf die Resistenzentwick-
lung der coliformen Darmflora bei Schweinen.
1. Mitteilung: Fütterungsversuche mit Terra-
mycin und Chloramphenicol.
Zb. Vet. Med. B 18 (1971), 385;

11. Bispig, W.: Die Kehrseite der Antibiotika-Therapie aus der Sicht der Veterinärmedizin.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 69 (1962), 495;
12. Blyth, M.W.: Detection and estimation of preservatives in milk,
Z. Lebensm. Unters. 5 (1902), 172; Analyst 16 (1901), 148 ref.
zitiert nach Kretzer (56);
13. Bonfert, W. und Berrang:
Hemmstoffnachweis im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung.
Arch. Lebensmittelhyg. 20 (1969), 61;
14. Brandis, H. und J. Šmarda:
Bacteriocine und bacteriocinähnliche Substanzen.
VEB - Gustav-Fischer - Verlag, Jena 1971;
15. Brüggemann, J., J. Tiews, I. Gropp, U. Lösch, K. König und H. Beck:
Ringuntersuchungen zum allgemeinen Hemmstofftest an definiertem Tiermaterial.
Zeitschr. für Tierphys., Tierernähr. und Futtermittelkunde 31 (1973), 171;
16. Brüggemann, J. und J. Tiews:
Zur Frage der Verwendung antibiotisch wirksamer Substanzen außerhalb medizinischer Therapie.
München. med. Wschr. 100 (1958), 1892;
17. Brüggemann, J., U. Lösch; V. Merckenschlager und I. Ofterdinger:
Ablagerungen von Tetracyclinen im Knochengewebe von Tieren bei dem Zusatz von Tetracyclin zum Futter.
Zbl. Vet. Med. Reihe A 13 (1966), 59;
18. Brunn, H.J.: Untersuchungen über die Anwendung einiger Nachweismethoden zur Feststellung von Antibiotika in Milch.
Diss. med. vet., Gießen 1971;
19. Bulling, E., R. Stephan und V. Sebek:
Übertragbare Arzneimittelresistenz bei Salmonellen.
Vortrag, gehalten auf der 14. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Freiburg 1971;
20. Bulling, E. und R. Stephan:
Die Wirkung der Antibiotikabeifütterung in nutritiven Dosen auf die Resistenzentwicklung der coliformen Darmflora bei Schweinen.
2. Mitteilung: Verbreitung von R-Faktoren durch die nutritive Antibiotika-Anwendung.
Zbl. Vet. med. B 18 (1972), 449;

21. Bulling, E. und R. Stephan:
Die Wirkung der Antibiotikafütterung in
nutritiven Dosen auf die Resistenzentwick-
lung der coliformen Darmflora bei Schweinen.
3. Mitteilung: R-Infektion von Salmonella-
bakterien in vivo.
Zbl. Vet. med. B 19 (1972), 268;
22. Carpenter, K. Patricia, S.P. Lapage and the late K.J. Steel:
Biochemical Identification of Enterobacteriaceae
in Gibbs, B.M. and F.A. Skinner:
Identification methods for microbiologists.
Academic Press, London - New York 1966;
23. Clarenburg, A. und E.H. Kampelmacher:
Die Bedeutung von Antibiotika mit besonderer
Berücksichtigung der Milzbrand- und Salmonel-
lendiagnostik.
Berl. Mch. tierärztl. Wchschr. 70 (1957), 203;
24. Coretti, K.: Mikrobiologischer Nachweis von Hemmstoffen
in Gelatine.
Fleischwirtschaft 11 (1959), 737;
25. Cowan, S. T. and K. J. Steel:
Manual for the identification of medical bacteria.
Cambridge University Press 1965;
26. Christensen, W.B.:
Urea decomposition as means of differentiating
Proteus and Paracolon cultures from each other
and from Salmonella and Shigella Types.
J. Bact. 52 (1946), 461;
zitiert nach Müller (71);
27. Dedek, J., E. Eylandt, J. Vogel:
Nachweis von Hemmstoffen im Rahmen der bakte-
riologischen Fleischuntersuchung.
Mh. für Vet. med. 26 (1971), 604;
28. Draheim, R.: Nachweis von Antibiotikarückständen im Rahmen
der bakteriologischen Fleischuntersuchung.
Mh. Vet.-Med. 26 (1971), 511;
29. Drews, H.: Untersuchungen des Hemmstoffgehaltes in Organen
und Muskulatur normalgeschlachteter Kälber aus
dem Einzugsbereich eines nordwestdeutschen
Schlachthofes.
Diss. med. vet., Hannover 1972;
30. Foltin, M.W.: Zur Frage des Salmonella-Nachweises bei der
Bakteriologischen Fleischbeschau nach der Anti-
biotikabeifütterung bzw. Therapie.
Diss. med. vet., München 1960;

31. Forschner, E.: Hemmstoffe in Organen von Schlachttieren.
Arch. Lebensmittelhyg. 13 (1962), 242;
32. Forschner, E.: Möglichkeiten der Stabilisierung von Untersuchungsmaterial für den biologischen Hemmstofftest.
Arch. Lebensmittelhyg. 23 (1972), 195;
33. Frank, H.: Antibiotikakontrolle und Möglichkeiten zur Vermeidung von Schäden im Betrieb.
Molk.- und Käs. Ztg. 14 (1963), 1453;
34. Gartside, R.N.: The detection of antibiotics in canned meats.
Vortrag, gehalten am 23.3.1960 (Food Group of the Society of Chemical Industry), London; zitiert nach Käferstein (41);
35. Gemmer, H. und H. Seeger:
Der Nachweis von Hemmstoffen in der bakteriologischen Fleischuntersuchung und seine Bedeutung für den Verbraucher.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 77 (1970), 577;
36. Gisske, W., S. Wenzel, J. Pichnarcik, J. Schaper und E. Ennen:
Allgemeiner Hemmstoffnachweis bei normal geschlachteten tauglich beurteilten Kälbern, Schweinen und Rindern.
Arch. Lebensmittelhyg. 21 (1970), 25;
37. Götze, U., und A. Dialili-Afchar:
Nachweis von Hemmstoffen in Muskelfleisch und Organen gesunder, normalgeschlachteter Schweine und Kälber und daraus abzuleitende Konsequenzen für die Schlachtier- und Fleischuntersuchung.
Fleischwirtschaft 53 (1973), 1117.
38. Grossklaus, D.: Rückstände im Fleisch, Vorkommen, Bedeutung sowie ihre Beurteilung im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung.
Bundesgesundheitsblatt 14 (1971), 205;
39. Harrigan, W.F. and Margaret E. McCance:
Laboratory methods in microbiology.
Academic Press London - New York 1966;
40. Heilmann, R.: Ringuntersuchung auf Hemmstoffe (Antibiotika) bei normalgeschlachteten Rindern, Schweinen und Kälbern an 11 Schlachthöfen in der BRD.
Diss. med. vet., Hannover 1971;
41. Käferstein, F.K.: Nachweis und Bedeutung des Vorkommens von Antibiotika im Fleisch von Schlachttieren.
Diss. med. vet., Gießen 1964;

42. Kampelmacher, E.H., P.A.M. Guinee und L.M.V. Noorle-Jensen:
Een eenvoudige onderzoeksmethode ter vaststelling
van antibiotica by slachtdieren, die tijdens
leven therapeutisch met antibiotica werden
behandeld.
Tijdschr. Diergenees. 87 (1962), 16;
zitiert nach Schaal (82);
43. Kelch, F. und K. Coretti:
Zum Nachweis von Aureomycin in Fleisch- und
Organproben von Schlachttieren.
Fleischwirtschaft 11 (1959), 358;
44. Kenner, B.A., H.F. Clark and P.E. Kabler:
Fecal streptococci in surface waters.
Appl. Microbiol. 9 (1961), 15;
zitiert nach Schmidt-Lorenz (86);
45. Kind, H.:
Hemmstoffe unter besonderer Berücksichtigung
der bakteriologischen Fleischuntersuchung.
Mh. Vet.-Med. 21 (1966), 903;
46. Kissling, R.:
Über die Beeinflussung der bakteriologischen
Fleischuntersuchung durch antibiotikahaltige
Organe.
Tierärztl. Umschau 47 (1960), 24;
47. Klein, D.:
Der Hemmstoff- und Hormonnachweis bei
Schlachttieren.
Tierärztl. Umschau 27 (1972), 24;
48. Kligler, J.I.:
A simple medium for the differentiation of
members of typhoid-paratyphoid group.
Am. J. Publ. Hlth. 7 (1917), 1042;
zitiert nach Merck (68).
49. Klima, H.:
Zur Frage des Hemmstoffnachweises anlässlich
der bakteriologischen Fleischuntersuchung.
Fleischwirtschaft 46 (1966), 1347;
50. Knothe, H.:
Übertragbare Arzneimittelresistenz bei apatho-
genen und pathogenen Darmbakterien.
Vortrag, gehalten auf der 14. Arbeitstagung
des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der
DVG in Freiburg 1971, Tagungsbericht S.59;
51. Knothe, H.:
Antibiotische Stoffe in der Tierhaltung und
mögliche Rückwirkungen auf den Menschen im
Hinblick auf Allergie und Resistenz.
Dtsch. Tierärztebl. 15 (1967), Sonderteil 26;
52. Kotter, L., G. Terplan und H. Schulz:
Biologischer Nachweis von Hemmstoffen in Le-
bensmitteln tierischer Herkunft.
Arch. Lebensmittelhyg. 10 (1959), 145;

53. Kotter, L.: Einschaltung eines biologischen Hemmstofftestes bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung.
Fleischwirtschaft 12 (1960), 188;
54. Kraak, J. und A. Tolle:
Zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest.
Arch. Lebensmittelhyg. 20 (1969), 145;
55. Kraak, J. und A. Tolle:
Brillantschwarz-Reduktionstest mit *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch.
Milchwiss. 22 (1963), 669;
56. Kretzer, K.: Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln tierischer Herkunft mit Hilfe des Katalasetestes.
Diss. med. vet., München 1962;
57. Kundrat, W.: Zur Differenzierung aerober Sporenbildner (Genus *Bacillus* Cohn).
Zbl. Vet. Med. Reihe B 10 (1963), 418;
58. Kundrat, W.: Methoden zur Bestimmung von Antibiotikarückständen in tierischen Produkten.
Zeitschr. Analyt. Chemie 243 (1968), 624;
59. Kundrat, W.: 45-Minuten-Schnellmethode zum mikrobiologischen Nachweis von Hemmstoffen in tierischen Produkten.
Fleischwirtschaft 52 (1972), 485;
60. Kusch, Doris, H. Siems und H.J. Sinell:
Zur Antibiotikaresistenz koagulasepositiver Staphylokokken aus verschiedenen Biotopen.
Zbl. Vet. Med. B 19 (1972), 285;
61. Levetzow, R.: Untersuchungen auf Hemmstoffe im Rahmen der Bakteriologischen Fleischuntersuchung.
Bundesgesundheitsblatt 14 (1971), 211;
62. Levetzow, R. und Weise:
Zur Rückstandsuntersuchung im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung.
Schlacht- und Viehhofztg. 74 (1974), 327;
63. Lorenzen, P.: Anwendung und Auswertung des Antibiotikatestes in der bakteriologischen Fleischuntersuchung.
Arch. Lebensmittelhyg. 18 (1967), 30;

64. Mantel, Th.: Ergebnisse von Untersuchungen nach einer einheitlichen Methode zum Nachweis von Hemmstoffen in Nieren bei Schlachttieren. Vortrag, gehalten auf der 14. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG in Freiburg 1971, Tagungsbericht S. 95;
65. Mantel, Th.: Ergebnisse des allgemeinen Hemmstoffnachweises bei Schweinefleisch und Schlachtgeflügel im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung. Fleischwirtschaft 52 (1972), 585;
66. Marth, E.H. und B.E. Elikson: Antibiotic residues in milk and milk products - a review. J. Milk Food Techn. 22 (1959), 241;
67. Mayr, A. und B. Bibrack: Antibiotikaallergien beim Tier. Berl. Mnch. tierärztl. Wschr. 82 (1969), 182;
68. Merck: Mikrobiologisches Handbuch. E. Merck, Darmstadt 1974;
69. Meyer, B., W. Thiel, W. Weiss: Bedeutung und Nachweis von Hemmstoffen im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Fleischwirtschaft 49 (1969), 203;
70. Meyn, A., J. Kalich und V. Merckenschlager: Der Einfluß der Antibiotikabeifütterung und Antibiotikatherapie auf das Ergebnis der Bakteriologischen Fleischuntersuchung. Berl. Mnch. tierärztl. Wschr. 73 (1960), 81;
71. Müller, J.: Zum Vorkommen von Proteus bei der bakteriologischen Untersuchung und seine Differenzierung. Diss. med. vet., München 1969;
72. Nassal, J. und L. Nieper: Hemmstoffnachweis bei der bakteriologischen Untersuchung im Raume Nordbaden. Tierärztl. Umschau 26 (1971), 580;
73. Nouws, J.F.M. und A.H.J.W. Smulders: Een evaluerend onderzoek van de Bacillus subtilis BGA - Sneltest. Tijdschr. Diergeneesk. 99 (1974), 1155;
74. Oberzill, W.: Die Antibiotika. Bank I, Teil I, Verlag Hans Carl, Nürnberg 1962;

75. Pichnarcik, J., S. Wenzel und W. Gisske:
Beitrag zur Methodik des Hemmstoffnachweises
in Organen und Muskulatur von Schlachttieren.
Arch. Lebensmittelhyg. 20 (1969), 272;
76. Piening, H.: Vergleich biologischer Methoden zum Nachweis
von Hemmstoffen in Schweinenieren.
Diss. med. vet., München 1962;
77. Psota, A.: Hemmstoffuntersuchungen der Lebensmittelunter-
suchungsanstalt der Stadt Wien.
Wiener tierärztl. Monatsschrift 60 (1973), 303;
78. Püschner, J.: Persönliche Mitteilung;
79. Roth, L.: Vergleich der quantitativen und qualitativen
Aussagefähigkeit des allgemeinen mikrobiolo-
gischen Hemmstofftestes mit dem mikrobiolo-
gisch-chemischen Antibiotikanachweisverfahren
bei normalgeschlachteten Schweinen, Kälbern
und Rindern.
Diss. med. vet., Hannover 1971;
80. Sawatzki, K.: Über die Häufigkeit des Hemmstoffnachweises
anlässlich der bakteriologischen Fleischunter-
suchung in Rheinland-Pfalz.
Tierärztl. Umschau 26 (1971), 603;
81. Schaal, E.: Erfahrungen über den mikrobiologischen Hemm-
stoffnachweis bei Geflügelfleisch.
Fleischwirtschaft 13 (1961), 561;
82. Schaal, M.: Untersuchungen über die Empfindlichkeit von
Testkeimen im allgemeinen Hemmstofftest und
mikrobiologisch-chemischen Test (MC-Test)
im Hinblick auf die qualitative und quantita-
tive Nachweismöglichkeit von Hemmstoffen (Anti-
biotika) im Fleisch.
Diss. med. vet., Hannover 1972.
83. Schaper, J.: Hemmstoffnachweis bei normal- und krankgeschlach-
teten Schweinen.
Diss. med. vet., Hannover 1970;
84. Scheibner, G.: Vorkommen und Abbau von Antibiotika im Fleisch.
Mh. Vet.-Med. 24 (1969), 739;
85. Scheibner, G.: Untersuchungen über die Beeinflussung verschiede-
ner Antibiotika durch die Brühwurst-
Herstellungstechnologie.
Mh. Vet.-Med. 2 (1972), 161;
86. Schmidt-Lorenz, W.: Methoden zur quantitativen Isolierung und Be-
stimmung von in Lebensmitteln vorkommenden
Bakterien.
Zbl. für Bakteriologie, Parasitenkunde, Hygiene,
I. Abteilung, Supplementheft 1, Gustav-Fischer-
Verlag, Stuttgart 1965;

87. Schmidt, U. und W. Woltersdorf:
Referat, gehalten anlässlich der Kulmbacher
Woche 1972; Tagungsbericht S. 37;
zitiert nach Beck und Mantel (7);
88. Schönherr, W.: Tierärztliche Milchuntersuchung.
S. Hirzel Verlag, Leipzig 1965;
89. Schothorst, van, M.: Residuen van Antibiotika in slachtdie-
ren.
Diss. med. vet., Utrecht 1969;
90. Schothorst, van, M.: Nachweis und Identifizierung einiger
Antibiotika in Schlachttieren.
Fleischwirtschaft 50 (1970), 1085;
91. Schothorst, van, M.: Über die Leistungsfähigkeit des Nieren-
testes bei der Bestimmung von Antibiotika-
rückständen in Fleisch.
Fleischwirtschaft 53 (1973), 703;
92. Schuler, A.: Beitrag zum Nachweis von Antibiotika-
Rückständen im Fleisch.
Schw. Arch. f. Tierheilk. 114 (1972), 413;
93. Schulz, H.: Ein Schnellnachweis für Hemmstoffe in Lebens-
mitteln tierischer Herkunft auf der Basis
von TTC.
Diss. med. vet., München 1962;
94. Simmons, J.S.: A culture medium for differentiating organisms
of typhoid-colon aerogenes groups and for
isolating of certain fungi.
J. infect Dis. 39 (1926), 209;
zitiert nach Merck (68);
95. Sinell, H.J.: Auswirkungen der Arzneianwendung auf die Le-
bensmittel- und Milchhygiene.
Dtsch. Tierärzteblatt 15 (1967), Sonderteil 30;
96. Society of American Microbiologists:
Manual of Microbiological Methods.
McGraw-Hill Book Company, New York - Toronto -
London 1957;
97. Sprockhoff, von, H.: Zum Nachweis von Antibiotika in der Niere
von Schlachttieren bei der bakteriologischen
Fleischuntersuchung mittels Triphenyltetrazo-
liumchlorid.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 67 (1960), 620;

98. Stavikova, M.: Über die Verwendung des Indigokarmin zum Nachweis von Streptomycin und Chloramphenicol in der Milch intramammär mit diesen Antibiotika behandelten Kühen.
Vet. med. Prag 14 (1969), 625;
zitiert nach Schaal (82);
99. Sturm, W.: Zum biologischen und chemischen Nachweis einiger Antibiotika.
Dtsch. Molkereiztg. 76 (1955), 832;
100. Takacs, J. und S. Kovacs:
Demonstration of Antibiotic Residues in the Meat of slaughtered Animals.
Acta Vet. acad. Sc. Hung. 19 (1969), 11;
zitiert nach Schaal (82);
101. Terplan, G. und K. J. Zaadhof:
Zum Vorkommen und Nachweis von Hemmstoffen in der Milch - eine kurze Übersicht.
Milchwissenschaft 22 (1967), 761;
102. Terplan, G., G. Bartel und K.J. Zaadhof:
Zum Nachweis von Hemmstoffen im Harn.
Arch. Lebensmittelhyg. 25 (1974), 261;
103. Verordnung zur Änderung der Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschaugesetz vom 18. Dezember 1973.
BGBl I 1974, Seite 18 ff.;
104. Vogel, H.: Antibiotika in der Haustierfütterung.
Editio Cantor/Aulendorff in Württemberg;
105. Walter, A.M. und L. Heilmeyer:
Antibiotika-Fibel.
3. Auflage, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1965;
106. Welz, W.: Beitrag zur Methodik biologischer Hemmstoffteste in Milch.
Arch. Lebensmittelhyg. 12 (1961), 196;
107. Welz, W.: Zur Frage einer möglichen Beeinflussung des Hemmstoffnachweises durch die in Pflanzen vorkommenden antibakteriellen Wirkstoffe.
Arch. Lebensmittelhyg. 18 (1967), 230;
108. Wenzel, S.: Ein neues chemisches Verfahren zum Nachweis von Antibiotikarückständen im Fleisch.
Vortrag, gehalten auf der 14. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG in Freiburg 1971, Tagungsbericht S. 88;

109. Wenzel, S.: Allgemeiner Hemmstoffnachweis bei krank geschlachteten Rindern und ein Vergleich mit den Hemmstoffnachweisen bei normal geschlachteten Tieren. Arch. Lebensmittelhyg. 22 (1971), 200;
110. Winter, A.G.: Die Heilpflanze des Matthiolus (1611) gegen Infektionen der Harnwege und Verunreinigungen der Wunden, bzw. zur Förderung der Wundheilung im Lichte der Antibiotikaforschung. Madaus Jahresbericht (1952), 7 - 12;

Zum Schluß möchte ich Herrn Privatdozent
Dr. W. KUNDRAT für die Überlassung des Themas,
sowie für den stets gewährten Rat und die Unter-
stützung bei der Durchführung der Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau A. KUNDRAT
für ihre Anteilnahme und Hilfe.

Gleichzeitig möchte ich Herrn Veterinärdirektor
Dr. J. PÜSCHNER am Städt. Schlachthof München
meinen Dank für zahlreiche Anregungen und sein
freundliches Entgegenkommen aussprechen.

LEBENS LAUF

Am 24. 3. 1948 wurde ich, Karl-Ernst Heimbücher, als erster Sohn des Landwirtes Karl Heimbücher und seiner Frau Erna, geb. Hettinger in Amorbach geboren. Ich besuchte in Amorbach die Volksschule und die dortige 6-klassige Oberrealschule. Im Jahre 1964 wechselte ich auf das Johannes-Butzbach-Gymnasium in Miltenberg über, wo ich im Juli 1967 die Reifeprüfung ablegte. Danach leistete ich meinen Wehrdienst ab und begann im Sommersemester 1969 das Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, welches ich im Frühjahr 1974 mit dem 3. Teil der Tierärztlichen Prüfung abschloß.

LEBENSLEISTEN

Im Jahre 1908 wurde ich, Karl Ernst Heilmann, als erster Sohn des Landwirts Karl Heilmann und seiner Frau Rosa, geb. Heilmann, im Ortsteil Kestern, im Landkreis in Ansbach, die Volksschule und die dortige 8-Klassige Oberrealschule, im Jahre 1924 wechselte ich auf das Johannes-Gutenberg-Gymnasium in Kitzingen über, wo ich im Juli 1927 die Reifeprüfung ablegte. Danach leistete ich meinen Wehrdienst ab und begann im Sommersemester 1928 das Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, welches ich im Frühjahr 1934 mit dem 1. Teil des Staatsexamen für Tierärzte abschloß.

Schnelldruck-Böhler, 87 Würzburg, Seilerstraße 10